

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA MEREDIANE KOCHEPKA

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLCOS A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS
RESIDUAIS EMPREGANDO A LIPASE NOVOZYM 435**

CURITIBA

2015

DÉBORA MEREDIANE KOCHEPKA

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEOS RESIDUAIS E
GORDURAS RESIDUAIS EMPREGANDO A LIPASE NOVOZYM 435**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Química,
Área de Concentração Química Orgânica, no
Curso de Pós-Graduação, setor de ciências
exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Luiz Pereira Ramos

Coorientadora: Nadia Krieger

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

K76p

Kochepka, Débora Merediane

Produção de ésteres etílicos a partir de óleos residuais e gorduras residuais empregando a LIPASE NOVOZYM 435 / Débora Merediane Kochepka . – Curitiba, 2015.

101 f. : il. color., tab. ; 30 cm

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2015.

Orientador: Luiz Pereira Ramos – Coorientadora: Nadia Krieger
Bibliografia: p. 94-101.

1. Ésteres. 2. Lipase. 3. Biodiesel. 4. Óleos e gorduras alimentícias – Resíduos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Krieger, Nadia. IV. Título.

CDD: 547.2

TERMO DE APROVAÇÃO

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS
EMPREGANDO A LIPASE NOVÖZYM 435**

por

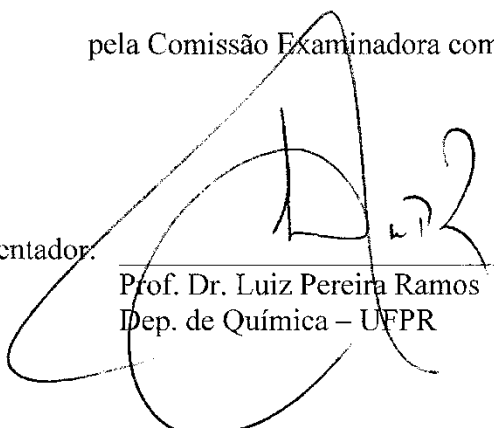
DÉBORA MEREDIANE KOCHEPKA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

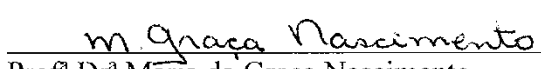
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

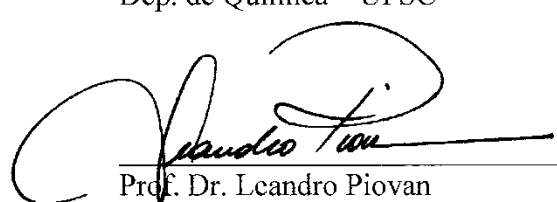
Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria da Graça Nascimento
Dep. de Química – UFSC



Prof. Dr. Leandro Piovan
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de abril de 2015.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Armindo e Odila, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Armindo e Odila Kochepka, aos quais agradeço todos os dias pelo seu imenso amor por mim. Vocês são minha fonte de renovação para seguir firme nesta caminhada.

Às minhas irmãs, Elisangela e Adriana, e a minha afilhada Luana, por me darem forças e apoio e me incentivarem nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Pereira Ramos, pelo companheirismo, conhecimento transmitido, dedicação, paciência e sabedoria que me servem de exemplo.

À minha co-orientadora, Professora Dr^a Nadia Krieger, pelas inúmeras contribuições e por todo conhecimento transmitido durante este período.

À minha amiga e companheira de trabalho Laís Pastre Dill, por todos os momentos, pela força e apoio incondicional, confiança e carinho.

Aos amigos Jonas Serres e Maritza A. Todo Bom, pela enorme contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pelo companheirismo e pela grande amizade que me proporciona momentos felizes todos os dias.

Ao Douglas H. Fockink, ao Mateus Barbian Urio e à Jacqueline Chimilovski, pela amizade, sorrisos e disponibilidade em contribuir, dar apoio e estímulo em todos os momentos necessários.

Aos amigos do Laboratório de Polímeros, Thiago Alessandre da Silva, Reinaldo Morita e Grece Senhorini Sargi pela amizade, apoio e companheirismo. Em especial ao doutorando Thiago, pelas inúmeras conversas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Alexis e ao Kanda, pelo apoio no decorrer do trabalho e aos amigos e ex-companheiros do CEPESQ, Francis Baumgaudt e Fabiano Rosa da Silva, pela apoio e ajuda.

Aos meus amigos de fora da academia, Caio Silva, Rafaely Weber, Isabella Capelari, Simone Dobner, Alice Schneider e Marcos Blau, por entenderem meus sumiços e compartilharem muitos momentos felizes, ultrapassando problemas de distância física.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) e do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), pelo apoio em todos os momentos requeridos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Leandro Piovan e Claudiney Soares Cordeiro, pelas inúmeras contribuições para a conclusão deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr^a. Maria da Graça Nascimento (UFSC) e Prof. Dr. Leandro Piovan.

À Prof. Dr^a. Leda Maria Saragiotto Colpini, por incitar em mim, desde a iniciação científica, a curiosidade pela vida acadêmica.

À Novozymes Latin América (Araucária – PR) pelo fornecimento da enzima comercial que foi empregada neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos e aos demais órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, FINEP e Fundação Araucária.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e do meu processo de aprendizagem.

*“The scientist, by the very nature of his commitment,
creates more and more questions, never fewer.
Indeed the measure of our intellectual maturity,
one philosopher suggests, is our capacity
to feel less and less satisfied with our answers to better problems”*

Gordon Allport

RESUMO

A produção brasileira de biodiesel emprega majoritariamente óleo de soja. Entretanto, esforços vêm sendo realizados para a diversificação das matérias-primas empregadas nesta indústria, visando uma maior viabilidade econômica do produto final. Industrialmente, a rota de produção de biodiesel utiliza catalisadores homogêneos de natureza alcalina na metanólise do material graxo. Por isso, parâmetros como o teor de ácidos graxos livres (AGLs) e água acarretam em diminuição no rendimento da reação e favorecimento de reações paralelas como a saponificação. Portanto, visando utilizar eficientemente materiais com essas características, há a necessidade da aplicação de catalisadores alternativos. Neste estudo, a lipase Novozym 435 (N435) foi utilizada na etanólise do óleo residual de fritura (ORF). A caracterização física e química do ORF demonstrou algumas variações em relação ao óleo de soja refinado, como o aumento no teor de AGLs, de água, e do índice de peróxidos. Ainda, observou-se a presença de hidroperóxidos provenientes de reações de degradação do óleo. Uma vez caracterizado, o ORF foi submetido à etanólise catalisada pela N435. Primeiramente, um estudo univariado foi realizado, que demonstrou que o uso de 10% de hexano neste sistema é desnecessário. Além disso, a adição de água ao sistema e o uso de etanol hidratado diminuiu os teores em ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) que foram obtidos no produto final. Através de um planejamento multivariado, o comportamento deste sistema foi avaliado e os efeitos das variáveis razão molar, quantidade de enzima, teor de ácidos graxos livres e teor de água sobre as reações de etanólise do ORF foram determinados empregando como resposta o teor total de EEAG do produto final. Nestes experimentos, a temperatura e a agitação foram fixadas em 40 °C e 150 rpm, respectivamente. Para o planejamento 2² com 4 pontos axiais, onde se avaliou as variáveis razão molar e quantidade de enzima, observou-se em 10 h de reação teores de EEAG de 80% nas condições de 5% de N435 e razão molar etanol:óleo de 9:1. Já o gráfico de Pareto indicou que, a um nível de 95% de significância, a quantidade de enzima (L) foi a variável com maior efeito positivo, de 14,89 pontos percentuais, sobre o teor de EEAG quando a porcentagem de enzima foi aumentada de 1% para 5%. Diversos tratamentos para a recuperação da atividade enzimática da N435 foram realizados, bem como ensaios de reuso do biocatalisador. Estes ensaios demonstraram que a atividade de transesterificação da enzima é recuperada após lavagem com *tert*-butanol, devido à semelhança entre os teores em EEAG obtidos após os 1º e 2º usos de uma mesma amostra de enzima. As reações em duas etapas, com a utilização de enzima fresca e recuperada, foram realizadas a fim de aumentar os teores em ésteres etílicos em ácidos graxos, porém, isto não se mostrou promissor, visto que os teores em EEAG se mantiveram similares à cinética sem adição de mais catalisador. Portanto, este trabalho demonstrou que é possível utilizar ORF na produção de ésteres etílicos empregando N435 como catalisador, já que elevados valores de EEAG foram obtidos nestes sistemas. Ainda, observou-se que a atividade da lipase N435 foi recuperada, o que pode tornar o seu emprego industrial mais viável para a produção de biodiesel. No entanto, o produto final não atendeu a alguns dos principais parâmetros da especificação nacional deste biocombustível.

Palavras-chave: etanólise, óleo residual de fritura, sistema livre de cossolvente, Novozym 435.

ABSTRACT

The Brazilian production of biodiesel use mainly soybean oil. However, some efforts have been performed for the diversification of the raw materials employed in this industry, in order to enhance the economic feasibility of the final product. Industrially, the biodiesel production pathway uses alkaline homogeneous catalysts for the methanolysis of fatty materials. Therefore, parameters such as free fatty acids and water content may cause a subtle decrease in reaction yields in favor of parallel reactions such as saponification. Hence, to be able to use fatty materials with these features efficiently, there is a need to apply alternative reaction catalysts. In this study, the Novozym 435 lipase (N435, Novozymes) was used in the ethanolysis of the waste cooking oil (WCO). The physical and chemical characterization of WCO demonstrated some changes in relation to the refined soybean oil, such as an increased free fatty acids content, water content and peroxide value. Moreover, the presence of hydroperoxydes was characterized and these resulted from the thermal degradation of soybean oil during cooking. After characterization of WCO, N435 was applied for the ethanolysis of WCO. Firstly, univariate studies were carried out and these revealed that there is no need for addition of *n*-hexane in this system. Furthermore, water addition to the system and the use of hydrated ethanol decreased the ethyl ester contents in the final product. Through of a multivariate design, the behavior of this system was evaluated and the effect of variables such as molar ratio (ethanol:WCO), enzyme loading, free fatty acids and water content on ethanolysis reaction of the WCO were measured employing the ethyl ester content of the final product as the process response. In these experiments, the temperature and agitation were maintained at 40 °C and 150 rpm, respectively. In the 2² experimental design plus 4 axial points, with ethanol:oil molar ratio and enzyme loading as the evaluated variables, the best condition was 5 wt% and 9:1 for a total ethyl ester content of 80 wt% in 10 h of reaction. The Pareto chart indicated that, at a significance level of 95%, the enzyme loading (L) was the variable with the greatest positive effect (14.89 p.p.) on the total ethyl ester content when the enzyme loading was increased from 1 to 5 wt%. Several treatments were used for recovering the activity of N435 after use and to allow the reuse of this biocatalyst. These tests demonstrated that the N435 transesterification activity is almost completely recovered after washing with *tert*-butanol and this was demonstrated by the similarity between the total ethyl ester content that was obtained after the 1st and 2nd uses of the same enzyme sample. Two-step reactions, with the utilization of fresh and recovered enzyme in the second step, were not successful to increase the total ethyl ester content of the final product since the the final results were similar to those obtained in a single reaction step, that is, without addition of more catalyst. Thus, this work evidenced the possible use of WCO in ethyl esters production by employing N435 as the reaction catalyst. High total ethyl ester contents were obtained in this system and the lipase activity was easily restored, which is important for its industrial application for biodiesel production. However, although with total ethyl ester contents as high as 88 wt%, the final product failed to meet the technical requirements of current national biodiesel standard.

Keywords: ethanolysis, waste cooking oil, solvent-free system, Novozym 435.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REAÇÕES DE DEGRADAÇÃO DE COMPONENTES DO ÓLEO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO DO AR.	22
FIGURA 2. MECANISMO SUGERIDO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO HOMOGÊNEA EM MEIO BÁSICO.....	24
FIGURA 3. MECANISMO SUGERIDO PARA A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	25
FIGURA 4. MECANISMO SUGERIDO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.	26
FIGURA 5. MECANISMO SUGERIDO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO HOMOGÊNEA EM MEIO ÁCIDO.....	27
FIGURA 6. REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ONDE R1, R2 E R3 SÃO CADEIAS ALQUÍLICAS).	29
FIGURA 7, MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES.	30
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO EM FITAS DA LIPASE DE <i>Candida antarctica</i> B COM ÊNFASE NO SEU SÍTIO CATALÍTICO.....	31
FIGURA 9. MECANISMO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÍDEOS CATALISADO POR LIPASES.....	32
FIGURA 10. ESTRUTURA DO ANTIOXIDANTE 2,6-di- <i>tert</i> -butil- <i>p</i> -cresol (DBPC)	50
FIGURA 11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÉSTERES METÍLICOS DA MATÉRIA GRAXA RESIDUAL.....	54
FIGURA 12. CROMATOGRAMA DE PERMEAÇÃO EM GEL DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF).....	56
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUE PODEM SER FORMADAS A PARTIR DE REAÇÕES TÉRMICAS E OXIDATIVAS ENVOLVENDO TRIACILGLICERÍDEOS E SEUS DERIVADOS.....	58
FIGURA 15. ESTUDO DO EFEITO DA AUSÊNCIA (A) E PRESENÇA (B) DE 10% DE <i>n</i> -HEXANO SOB O TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.....	61
FIGURA 16. ESTUDO DO EFEITO DA RAZÃO MOLAR ETANOL:ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.....	64
FIGURA 17. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CATALISADOR NO TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.....	65
FIGURA 18. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA SOB O TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.	67
FIGURA 19. VALORES OBSERVADOS PARA A CONVERSÃO vs. VALORES PREVISTOS PARA A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS.....	71
FIGURA 20. DIAGRAMA DE PARETO DA CONVERSÃO TOTAL EM ÉSTERES ETÍLICOS.....	72

FIGURA 21. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE RAZÃO MOLAR E ENZIMA SOB A RESPOSTA EXPRESSA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.....	73
FIGURA 22. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE ÁGUA (%) E ENZIMA (%) SOB A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.....	74
FIGURA 23. DIAGRAMA DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS DEPENDENTES AVALIADAS.	77
FIGURA 24. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE ENZIMA E RAZÃO MOLAR PARA A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTRES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.	78
FIGURA 25. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE DE LAVAGEM NA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE NOVOZYM 435.	83
FIGURA 27. ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO EM DUAS ETAPAS COM 100% DE ETANOL NA SEGUNDA ETAPA EM RELAÇÃO AO EMPREGADO NA PRIMEIRA ETAPA.	86
FIGURA 28. CINÉTICA DA REAÇÃO QUE RESULTOU NO MAIOR TEOR EM EEAG DO PLANEJAMENTO ESTRELA (PONTO E9).	86
FIGURA 29. CROMATOGRAMAS DE PERMEAÇÃO EM GEL DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA ANTES E APÓS A REAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. TRABALHOS RECENTES SOBRE REAÇÕES CATALISADAS PELA LIPASE NOVOZYM 435 NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS.....	33
TABELA 2. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS AVALIADOS PARA O ÓLEO DE SOJA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF).	39
TABELA 3. VARIÁVEIS INDEPENDENTES AVALIADAS EM TRÊS NÍVEIS PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
TABELA 4. COMBINAÇÕES DE VARIÁVEIS DEFINIDAS PELO SOFTWARE STATISTICA 10.0.....	46
TABELA 5. COMBINAÇÃO DE NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.....	47
TABELA 6. PARÂMETROS E METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS.....	50
TABELA 7. ANÁLISE DE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF) E DO ÓLEO DE SOJA REFINADO (OS).	52
TABELA 8. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF) E DO ÓLEO DE SOJA REFINADO (OS).	55
TABELA 9. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO $3^{(4-1)}$	69
TABELA 10. ANÁLISE DE VARIÂNCIA SIMPLES PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS RESULTADOS DE CONVERSÃO DA TABELA 9.	70
TABELA 11. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 EM ESTRELA PARA A OTIMIZAÇÃO DA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.....	75
TABELA 12. PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA SIMPLES PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS RESULTADOS DA TABELA 11.	76
TABELA 13. INFLUÊNCIA DAS MASSAS DE LIPASE RECUPERADAS APÓS CADA CICLO DE REAÇÃO NA CONVERSÃO DE ETANÓLISE.....	79
TABELA 14. QUANTIFICAÇÃO DE GLICEROL PRESENTE NO MEIO DE REAÇÃO E ADERIDO AO SUPORTE DA LIPASE.....	80
TABELA 15. CICLOS DE REUSO DA NOVOZYM 435 LAVADA COM <i>tert</i> -BUTANOL E LAVADA COM <i>TERC</i> -BUTANOL E ÁGUA, ATIVADA A 40 °C POR 1 HORA NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.	84
TABELA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÉSTERES ETÍLICOS FORMADOS MAJORITARIAMENTE A PARTIR DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.....	87
TABELA 17. PARÂMETROS CARACTERIZADOS DO PRODUTO FINAL.	88

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGL – Ácidos Graxos Livres

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AOT- Soma das Áreas dos Picos dos Produtos de Degradação do ORF

ANOVA – Análise de Variância simples

AOCS – *American Oil Chemists' Society*

Asp - Aspartato

CG – Cromatografia de Fase Gasosa

Glu – Glutamato

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPG – Cromatografia de Permeação em Gel

DAG - Diacilglicerídeo

DIC – Detector de Ionização por Chama

EEAG – Éster Etílico de Ácido Graxo

EMAG – Éster Metílico de Ácido Graxo

EN - *European Normalization*

ENZ – Porcentagem de enzima

ETOH - Etanol anidro 99,5% (v v⁻¹)

eV – elétron-Volt

His - Histidina

I.P. – Índice de Peróxido

I.A. – Índice de Acidez

I.S. – Índice de Saponificação

IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

MM – Massa Molar

mmol – milimol

MA – Massa molar do ácido oleico dividida por 10

MS – *Mass Spectrometer*

MAG – Monoacilglicerídeo

N435- Lipase comercial Novozym 435

ORF- Óleo Residual de Fritura

OS – Óleo de soja refinado

p.p. – pontos percentuais

p.c. – ponto central do planejamento multivariado

PCC – Planejamento Composto Central

PNPB – Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel

PRO-ÓLEO – Programa Nacional de Óleos Vegetais

PROALCOOL – Programa Nacional do Álcool

RM – Razão Molar Etanol:Óleo

rpm – Rotações por minuto

Ser - Serina

TAG – Triacilglicerídeo

U – Unidade de atividade enzimática

V.C. – Valor codificado

SUMÁRIO

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1.	Contextualização sobre o uso e produção de biodiesel	16
1.1.1.	Brasil e o biodiesel: um panorama atual.....	17
1.2.	Matérias-primas para a produção de biodiesel	18
1.2.1.	Emprego de óleos residuais de fritura para a produção de biodiesel	20
1.3.	Rotas catalíticas de produção de biodiesel	23
1.3.1.	Catálise homogênea.....	23
1.3.1.1.	Transesterificação em meio básico	23
1.3.1.2.	Transesterificação em meio ácido	26
1.3.2.	Catalisadores heterogêneos	27
1.4.	Definição, características e aspectos relacionados à aplicação de lipases	28
1.4.1.	Utilização de lipases na síntese de ésteres alquílicos	33
2.	OBJETIVOS	38
2.1.	Objetivo geral	38
2.2.	Objetivos específicos.....	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1.	Material	39
3.2.	Metodologia experimental	39
3.2.1.	Caracterização de parâmetros físicos e químicos da matéria graxa	39
3.2.1.1.	Análise dos produtos de degradação do óleo residual de fritura	41
3.2.1.2.	Determinação quantitativa dos componentes de degradação	42
3.2.1.3.	Determinação do perfil cromatográfico da matéria-prima	42
3.2.2.	Determinação da atividade de esterificação em meio orgânico.....	43
3.2.3.	Determinação da atividade de hidrólise em pHStat	43
3.2.4.	Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico	44
3.2.5.	Estudos preliminares de etanólise do óleo residual de fritura.....	44
3.2.6.	Pré-otimização multivariada da produção de ésteres etílicos.....	45
3.2.7.	Ajuste das condições da etanólise do óleo residual de fritura em frascos agitados.....	47
3.2.8.	Análise de dados estatísticos dos estudos preliminares univariados e multivariados.....	48
3.2.9.	Determinação dos níveis de adsorção de glicerol na lipase N435	48
3.2.10.	Ensaio de recuperação e reuso do biocatalisador	48
3.2.11.	Reações de transesterificação etílica em duas etapas sequenciais	49

3.2.12.	Caracterização do produto final e ensaios de adição de antioxidantes ...	49
3.2.13.	Cromatografia de permeação em gel e cromatografia gasosa para análise dos ésteres alquílicos	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1.	Caracterização da matéria graxa	52
4.2.	Determinação das atividades de hidrólise e síntese de ésteres da N435	59
4.3.	Ensaio preliminar de etanolise do óleo residual de fritura	60
4.3.1.	Efeito da adição de cossolvente	60
4.3.2.	Efeito da razão molar.....	63
4.3.3.	Efeito da quantidade de enzima	65
4.3.4.	Efeito do teor de água	66
4.4.	Pré-otimização fatorial fracionada para a produção de ésteres etílicos ..	68
4.5.	Ajuste das condições da etanolise do óleo residual de fritura em frascos agitados.....	75
4.6.	Determinação dos componentes polares adsorvidos à lipase e estudo do tratamento com solvente para manutenção da atividade enzimática	79
4.7.	Ensaio de reuso e recuperação da lipase N435.....	82
4.8.	Reações de etanolise em duas etapas	85
5.	CONCLUSÃO.....	92
6.	REFERÊNCIAS	94

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Contextualização sobre o uso e produção de biodiesel

A utilização de combustíveis renováveis, como o biodiesel, cresce globalmente devido às questões ambientais e econômicas vinculadas ao uso intensificado de fontes energéticas de origem fóssil (BERRIOS *et al.*, 2011). Além destas questões, o emprego do biodiesel apresenta vantagens em relação ao diesel mineral como o seu caráter renovável, já que sua matéria-prima é de ocorrência natural e tem curto ciclo de produção, melhor biodegradabilidade e lubricidade, menor toxicidade devido aos baixos teores de enxofre e aromáticos. Ainda, possui um maior número de cetano e assim uma melhor a qualidade na ignição e ponto de fulgor que garante maior segurança na sua estocagem e manuseio (KNOTHE *et al.*, 2006; MENDOW *et al.*, 2011a; BANKOVIĆ-ILIĆ *et al.*, 2014; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

O biodiesel é composto por ésteres mono-alquilados derivados de ácidos graxos que podem ser produzidos pela transesterificação de triacilglicerídeos ou pela esterificação de ácidos graxos de cadeia longa (C_{14} – C_{20}), a partir de materiais de origem vegetal e/ou animal e de álcoois mono-hidroxilados de cadeia curta (C_1 – C_4), preferencialmente na presença de um catalisador de natureza química ou biológica em um processo que pode ser homogêneo ou heterogêneo. Industrialmente, este biocombustível é produzido através da metanólise de óleos e gorduras em processos catalisados principalmente pelo metóxido de sódio e, em alguns casos, pelo uso de hidróxidos de sódio ou de potássio (DEMIRBAS, 2005; PISARELLO *et al.*, 2010; MENDOW *et al.*, 2011b; ARANSIOLA *et al.*, 2014).

O metanol ainda é o álcool mais utilizado mundialmente nestas indústrias por ser mais barato e mais reativo, além de garantir uma melhor separação das fases de glicerina e de ésteres graxos ao término do processo (DEMIRBAS, 2005). Contudo, o metanol é altamente tóxico, o que compromete a segurança dos trabalhadores nas indústrias, e ainda apresenta baixa miscibilidade com materiais graxos, acarretando em problemas de transferência de massa durante a reação de alcóolise, diminuindo a eficiência no contato dos reagentes e afetando a velocidade desta reação (ISSARIYAKUL *et al.*, 2007; ADACHI *et al.*, 2013).

A aplicação do etanol como aceptor de acila para produzir biodiesel proporciona características diferenciadas ao combustível, como caráter 100% renovável, maior número de cetano e melhores propriedades de fluxo a frio (e.g., ponto de névoa, ponto de entupimento de filtro a frio ou ponto de fluidez) (CLARK *et al.*, 1984; ENCINAR *et al.*, 2007; MENDOW, VEIZAGA e QUERINI, 2011b; CHESTERFIELD *et al.*, 2012). Além de ser menos reativo e mais caro que o metanol, o etanol acarreta em problemas processuais na etapa de purificação dos ésteres etílicos, como a dificuldade de separação das fases devido ao efeito de cossolvência. Ademais, pode formar emulsões no meio de reação e acarretar em dificuldade na recuperação do excesso de álcool por simples destilação devido à formação de misturas azeotrópicas com a água (ENCINAR, GONZÁLEZ e RODRÍGUEZ-REINARES, 2007; MENDOW, VEIZAGA e QUERINI, 2011b; ADACHI, *et al.*, 2013; SERRES *et al.*, 2015).

O cenário de produção de biodiesel no Brasil poderia ser diferenciado do mundial, já que no país o etanol apresenta alta viabilidade econômica principalmente porque há abundância de matérias-primas e disponibilidade de tecnologias de primeira geração (cana-de-açúcar) que permitem a sua produção em escala industrial para suprir a demanda (UNICA, 2015). No entanto, o emprego do etanol em escala industrial pode ser um problema, já que é necessário o desenvolvimento de plantas de produção mais eficientes, bem como o aperfeiçoamento dos métodos para certificação dos ésteres etílicos, como o teor em ésteres totais que é calculada com base em um padrão metílico, visto que as legislações vigentes não são plenamente adequadas para a análise dos parâmetros requeridos (LUQUE e MELERO, 2012; RAMOS e WILHELM, 2005).

1.1.1. Brasil e o biodiesel: um panorama atual

No Brasil, a crise do petróleo que se instaurou nas décadas de 1970 e 1980 motivou a criação do programa PROALCOOL, que visava implementar o uso do etanol hidratado como combustível e a adição do etanol anidro em misturas de até 20% na gasolina. Concomitantemente, criou-se outro programa denominado PRO-ÓLEO que objetivava utilizar misturas de até 30% de quaisquer óleos vegetais no diesel mineral. Porém, em 1986, houve queda nos preços internacionais do petróleo e consequente aumento do seu uso, repercutindo em desmotivação aos programas associados à produção de combustíveis renováveis (POUSA *et al.* 2007).

Ao final do século 20, o governo federal reiniciou as discussões sobre o uso de biodiesel e, então, no dia 04 de dezembro de 2004, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) com o objetivo de garantir o desenvolvimento regional e a inclusão social a partir da produção deste biocombustível. As misturas de biodiesel ao diesel mineral começaram a ser usadas em caráter obrigatório em Janeiro de 2008, no percentual de 2% (B2) e aumentos graduais desta adição foram propostos devido ao aumento da produção nacional, chegando a 5% em Janeiro de 2010. Dentre os principais quesitos que deram força à expansão do programa de produção de biodiesel no Brasil, estão a diminuição das exportações de diesel mineral, o aumento na demanda de energia em áreas remotas com pouco acesso à energia elétrica, a oportunidade econômica oferecida aos produtores locais a partir do cultivo de diversificadas oleaginosas e a diminuição do impacto ambiental associado ao uso de combustíveis fósseis (POUSA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2011; ANP, 2015; MME, 2015).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da Lei nº 11.097, assumiu, a partir de 2005, a competência de administrar e regulamentar as questões vinculadas à produção e comercialização do biodiesel (ANP, 2015). No mês dezembro de 2015, a capacidade autorizada de produção das 58 indústrias de biodiesel do Brasil foi de 643.515 m³, porém, apenas 347.769 m³ foram ofertados ao mercado. Esta parcela é ofertada em leilões e este biodiesel é adicionado ao diesel mineral na proporção de 7%, conforme regulamenta a lei 13.033 de 24 de setembro de 2014 (ANP, 2015).

1.2. Matérias-primas para a produção de biodiesel

Óleos e gorduras são compostos hidrofóbicos constituídos majoritariamente por lipídeos que têm distintos pontos de fusão, o que permite a sua diferenciação conforme o seu estado físico à temperatura ambiente (25 °C), já que nesta condição os óleos são líquidos e as gorduras são sólidas ou pastosas (SUBRAHMANYAM *et al.*, 1994; MA e HANNA, 1999). Os triacilglicerídeos são as moléculas que predominam nestes materiais graxos, porém, outros compostos, em quantidades minoritárias, como fosfolipídeos, esteróis, água, ácidos graxos livres e outros contaminantes estão presentes em sua composição (MA e HANNA, 1999). Estas matérias-primas de alto poder calorífico provêm de diversas fontes e apresentam similaridade estrutural com os componentes do diesel mineral e,

portanto, podem ser empregados como material de partida para a produção de biodiesel (SOLOMONS, 1996; KNOTHE *et al.*, 2006).

Anteriormente à invenção do biodiesel, alguns óleos vegetais já haviam sido testados como fonte de energia para motores do ciclo diesel porque apresentam vantagens como a alta disponibilidade e alto conteúdo energético (MA e HANNA, 1999). Entretanto, o uso direto de óleos vegetais gerou inconvenientes como elevados depósitos de carbono devido a sua alta viscosidade cinemática e baixa volatilidade, problemas de lubrificação, formação de borras e obstrução de orifícios dos injetores pela formação de coque, dificultando a atomização do combustível (KNOTHE *et al.*, 2006; MEHER *et al.*, 2006). Assim, uma alternativa para a redução destes inconvenientes residem na sua conversão a ésteres alquílicos que compõem o biodiesel.

A escolha das matérias graxas empregadas na produção de biodiesel depende principalmente dos arranjos produtivos locais, da viabilidade técnica e econômica, do rendimento por hectare e da composição do óleo (KNOTHE, 2002; KIAKALAIEH, AMINA e MAZAHARI, 2013; GULDHE *et al.*, 2015).

Mundialmente, existem mais de 350 plantas oleaginosas e como citado anteriormente, o biodiesel pode ser produzido a partir de vários destes materiais graxos. Porém, a utilização de óleos comestíveis responde por 95% da produção global de biodiesel (GULDHE *et al.*, 2015). Este cenário coincide com os índices brasileiros pois, conforme o boletim de dezembro da ANP, o óleo de soja (74,28%), a gordura bovina (20,59%), o óleo de algodão (3,61%) e outros materiais graxos, incluindo o óleo residual de fritura (0,83%), foram as matérias-primas mais empregadas no Brasil para a produção de biodiesel (ANP, 2014). Assim, ainda é predominante a utilização de matérias-primas de alto valor agregado que normalmente são também utilizadas para fins alimentícios e que apresentam alta flutuação de preços por serem controladas pelo mercado internacional (*commodities*) (TAKASE *et al.*, 2015).

Uma alternativa para diminuir os custos de produção do biodiesel é a utilização de matérias-primas residuais, pois estas poderiam contribuir para a diminuição do custo de produção do biocombustível. Exemplos de materiais graxos residuais são gorduras animais de esgoto e óleos de origem doméstica, industrial ou comercial, como os provenientes do processo de cocção e que já não mais servem para este propósito (SOARES *et al.*, 2013). Além da questão

econômica, o emprego de óleos residuais na indústria do biodiesel também oferece vantagens porque isto lhes dá uma destinação ambientalmente correta e evita que seja descartado em lugares impróprios como aterros ou rios (MAHESH *et al.*, 2015). Desta forma, há um grande interesse no desenvolvimento de processos em que o uso destas matérias-primas não afete os rendimentos, garanta a qualidade do produto final e proporcione uma diminuição nos custos do produto final (GEORGOGIANNI *et al.*, 2009).

Óleos e gorduras são denominados como não comestíveis quando em sua composição existem toxinas (e.g. a ricina do óleo da mamona) inadequadas para o consumo humano e animal (GUI *et al.*, 2008), mas estas características não interferem na sua aplicação para produção de biodiesel. Diversos autores já relataram a aplicação de materiais graxos não comestíveis na síntese do biodiesel (GHADGE e RAHEMAN, 2005; KANSEDO *et al.*, 2009; PATIL e DENG, 2009; CAMPANELLI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011). Apesar da vantagem econômica, o seu cultivo requer investimentos que podem aumentar o custo do óleo, visto que as cultivares necessitam de irrigação, agrotóxicos e fertilizantes (GUI, LEE e BHATIA, 2008). Portanto, a aplicação dos resíduos domésticos e agroindustriais como materiais graxos na produção de biodiesel reduziria os custos do óleo em até 50% (ZHANG, 2003).

1.2.1. Emprego de óleos residuais de fritura para a produção de biodiesel

Os resíduos de óleos e gorduras comestíveis são obtidos posteriormente a sua utilização na preparação de alimentos porque, após determinado tempo de uso, estes materiais deixam de ser adequados para a alimentação humana e animal (GUI, LEE e BHATIA, 2008).

O processo de fritura promove a formação de diversos compostos voláteis e não voláteis derivados de reações termolíticas, hidrolíticas e oxidativas que modificam as propriedades funcionais, organolépticas e nutricionais do óleo. Isto porque, durante o processo de fritura, diversos produtos de degradação são formados como, por exemplo, substâncias cíclicas, ácidos graxos livres, monoacilglicerídeos diacilglicerídeos, compostos de alta massa molar e baixa polaridade, hidrocarbonetos e produtos provenientes de reações de autooxidação, a exemplo de oxipolímeros (FIGGE, 1971; CHANG *et al.*, 1978; WOLFF *et al.*, 1991; STEEL *et al.*, 2006). As reações na presença de ar atmosférico, conforme demonstrado na FIGURA 1 são iniciadas pelo oxigênio em seu estado singlete

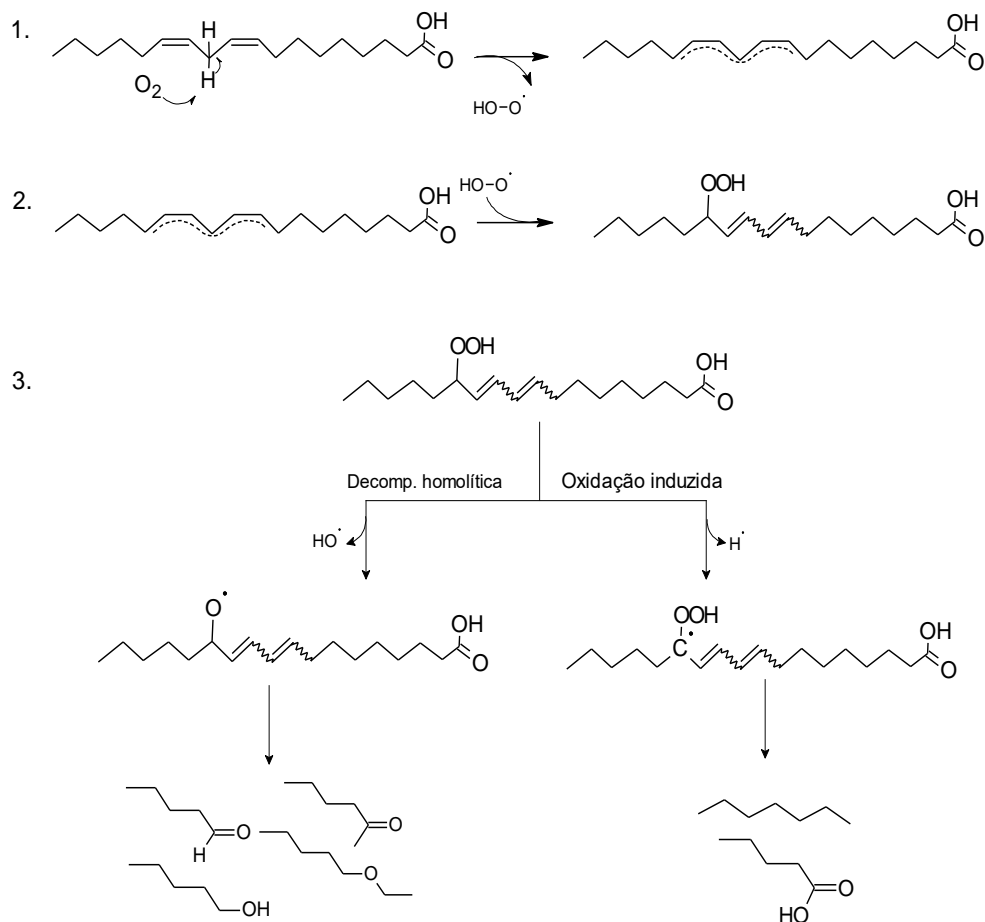
($^1\text{O}_2$) ou triplete ($^3\text{O}_2$) e têm três etapas: iniciação, propagação e terminação, sendo que a primeira etapa é a auto-oxidação do éster, iniciada nas ligações duplas presentes nos ácidos poliinsaturados, com a posterior formação de peroxirradicais e, em seguida, a sua decomposição nos mais diversos produtos derivados na etapa terminal. Já para as reações na ausência de oxigênio, como a de Diels-Alder, os ácidos poliinsaturados podem conjugar-se e posteriormente combinar-se resultando em sistemas cíclicos, conforme demonstrado na FIGURA 1 (FIGGE, 1971).

Normalmente, óleos residuais são reciclados e utilizados na produção de sabão ou como fluido hidráulico lubrificante. Assim, a indústria do biodiesel pode atribuir uma destinação mais valorosa para este material graxo (LUQUE e MELERO, 2012).

Alguns autores já realizaram a conversão do óleo residual de fritura (ORF) em ésteres alquílicos (ZHANG, 2003; WANG *et al.*, 2007; TALUKDER *et al.*, 2010; CHESTERFIELD *et al.*, 2012). Entretanto, as características físicas e químicas destes óleos podem não se adequar a todos os processos catalíticos utilizados industrialmente.

A dificuldade do emprego de óleos residuais na transesterificação em meio alcalino se dá devido à presença bastante comum de altos teores de ácidos graxos livres (AGLs) ($>1,0\% \text{ m m}^{-1}$) e de altos teores de água em sua composição (WANG *et al.*, 2011; LUQUE e MELERO, 2012). Portanto, a escolha do catalisador para conversão de óleos residuais é limitada por estas propriedades da matéria-prima (WANG, PENGZHAN e ZHANG, 2007). Assim, a utilização eficiente da catálise homogênea convencional para a conversão de ORF requer adição de uma etapa processual de pré-esterificação ácida (CAMPANELLI, BANCHERO e MANNA, 2010; CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE, 2014). Isto porque, nesta etapa, os AGLs são convertidos a ésteres alquílicos e isto evita a formação de sais de ácidos graxos (sabões) na etapa alcalina, evitando a diminuição dos rendimentos e os problemas na separação das frações que contêm ésteres e glicerina (CHESTERFIELD *et al.*, 2012). Por outro lado, rotas catalíticas alternativas vêm sendo estudadas para a utilização eficiente destes materiais (GHADGE e RAHEMAN, 2005).

I. Na presença de oxigênio atmosférico



II. Na ausência de oxigênio

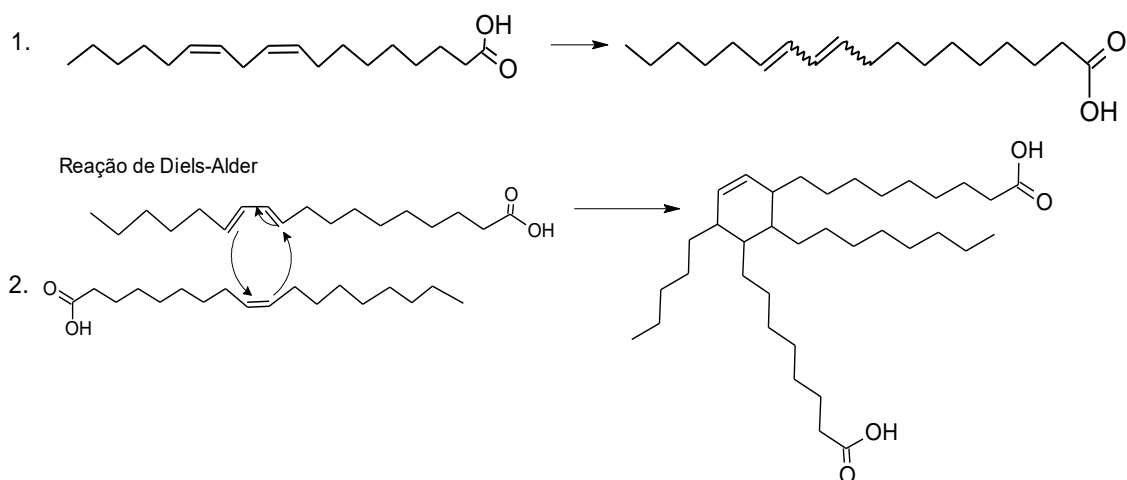


FIGURA 1. REAÇÕES DE DEGRADAÇÃO DE COMPONENTES DO ÓLEO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO DO AR.

FONTE: Adaptado de MARTINS, MELLO e SUAREZ (2013); FIGGE (1971).

1.3. Rotas catalíticas de produção de biodiesel

Os parâmetros físicos e químicos da matéria-prima podem definir a rota catalítica a ser empregada na produção de biodiesel, como as de natureza ácida, básica ou enzimática (VELJKOVIĆ *et al.*, 2012). Além disso, os catalisadores utilizados neste processo podem ser homogêneos (quando existe apenas uma fase no sistema) ou heterogêneos (quando há mais de uma fase no sistema), sendo que, neste caso, a reação acontece na interface formada entre os reagentes e o catalisador (COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY, 2015).

1.3.1. Catálise homogênea

1.3.1.1. Transesterificação em meio básico

Há muitos relatos da aplicabilidade das reações de transesterificação em processos industriais. Esta reação, onde um éster é transformado em outro pelo intercâmbio de frações alcóxi, é o processo mais utilizado na produção de biodiesel porque é o mais rápido e econômico (VELJKOVIĆ, AVRAMOVIĆ e STAMENKOVIĆ, 2012; GUO, SONG e BUHAIN, 2015). Na indústria do biodiesel, esta reação, que acontece em três etapas reversíveis, emprega como reagentes os triacilglicerídeos pré-aquecidos (50-60 °C) que estão presentes nos materiais graxos e um álcool monohidroxilado de cadeia curta, na presença de um catalisador de caráter fortemente ácido ou básico.

A adição de um catalisador acelera a velocidade da reação, aumentando a produtividade do processo e fazendo com que esta entre mais rapidamente em equilíbrio (ARANSIOLA *et al.*, 2014; GUO, SONG e BUHAIN, 2015). No caso da metanólise homogênea catalisada por base (FIGURA 2), o metóxido é adicionado volumetricamente ao reator, em uma proporção de 20% em relação à massa do óleo. Após 2 h de reação sob agitação intensa, o meio de reação é centrifugado ou fica em repouso durante 2 a 12 h para a separação de fases éster e glicerina e, posteriormente, os ésteres metílicos são purificados para remoção de resíduos (e.g. metanol, sais de ácidos graxos, água) através da lavagem com água (DOMINGOS *et al.*, 2008; GUO, SONG e BUHAIN, 2015).

Conforme apresentado na FIGURA 2, na primeira etapa da proposta de mecanismo da reação de transesterificação homogênea em meio alcalino, há a formação do íon alcóxido e, posteriormente, o ataque deste nucleófilo ao carbono

da carbonila do triacilglicerídeo. Em seguida, um intermediário tetraédrico é gerado e, ao se rearranjar, libera um ânion alcóxido que se combina com o ácido conjugado da base (1ª etapa), eliminando um diacilglicerídeo e também uma molécula de éster alquílico. Uma vez que esta reação acontece em três etapas sucessivas e reversíveis, outros produtos como monoacilglicerídeos e glicerol são liberados durante o processo (SCHUCHARDT *et al.*, 1997).

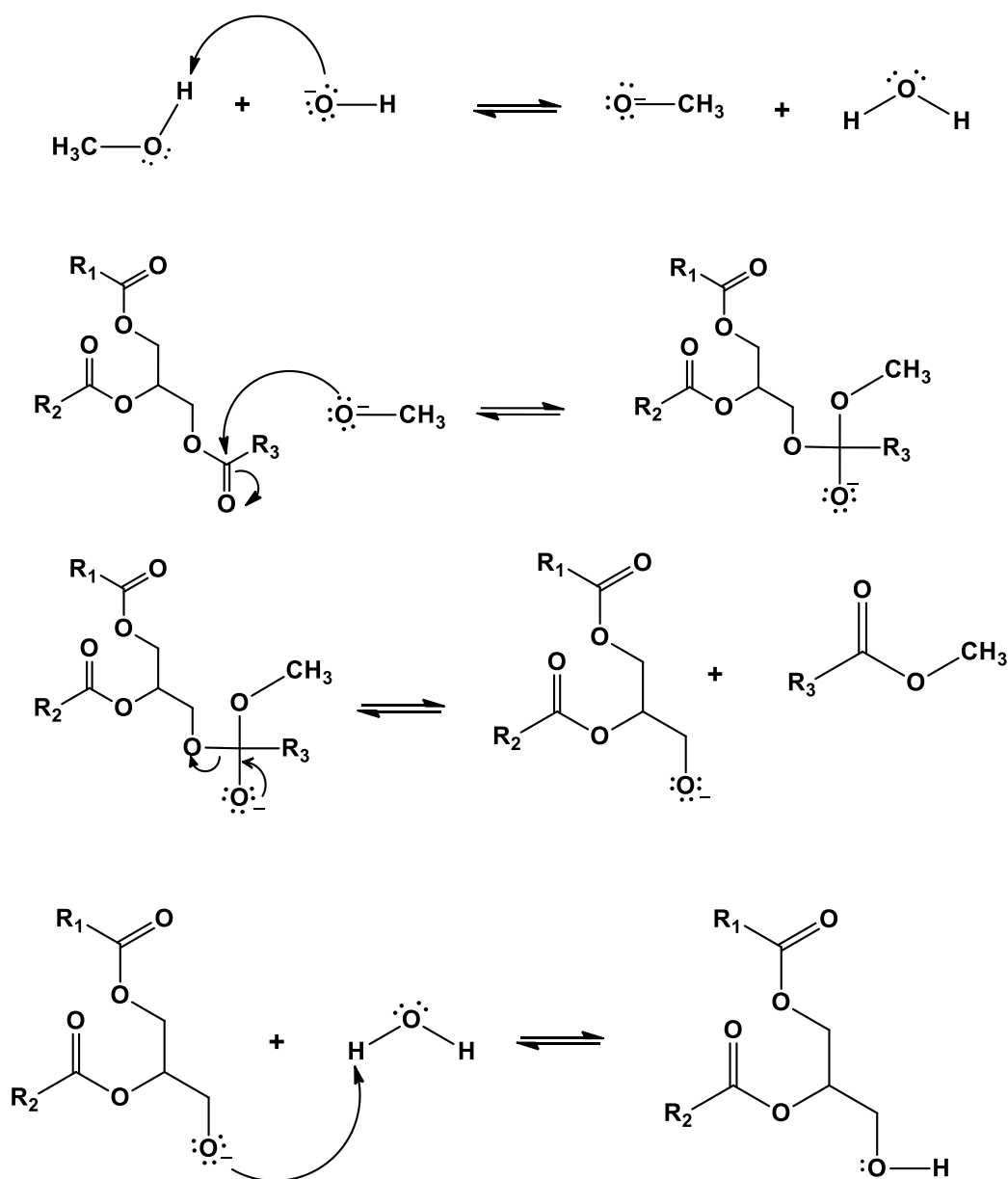


FIGURA 2. MECANISMO SUGERIDO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO HOMOGÊNEA EM MEIO BÁSICO.

FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS (1997).

Este processo é eficiente com o emprego de matérias-primas que contenham teores menores que 0,5 % de AGLs e 0,06% de água, evitando assim

a geração de sais de ácidos graxos que dificultam a posterior recuperação do produto de interesse (AARTHY *et al.*, 2014). Caso contrário, uma forma de contornar este inconveniente e não afetar o rendimento do processo seria a adição de uma etapa adicional ao processo, como a prévia esterificação (FIGURA 3) dos ácidos graxos livres e posterior transesterificação homogênea em meio alcalino.

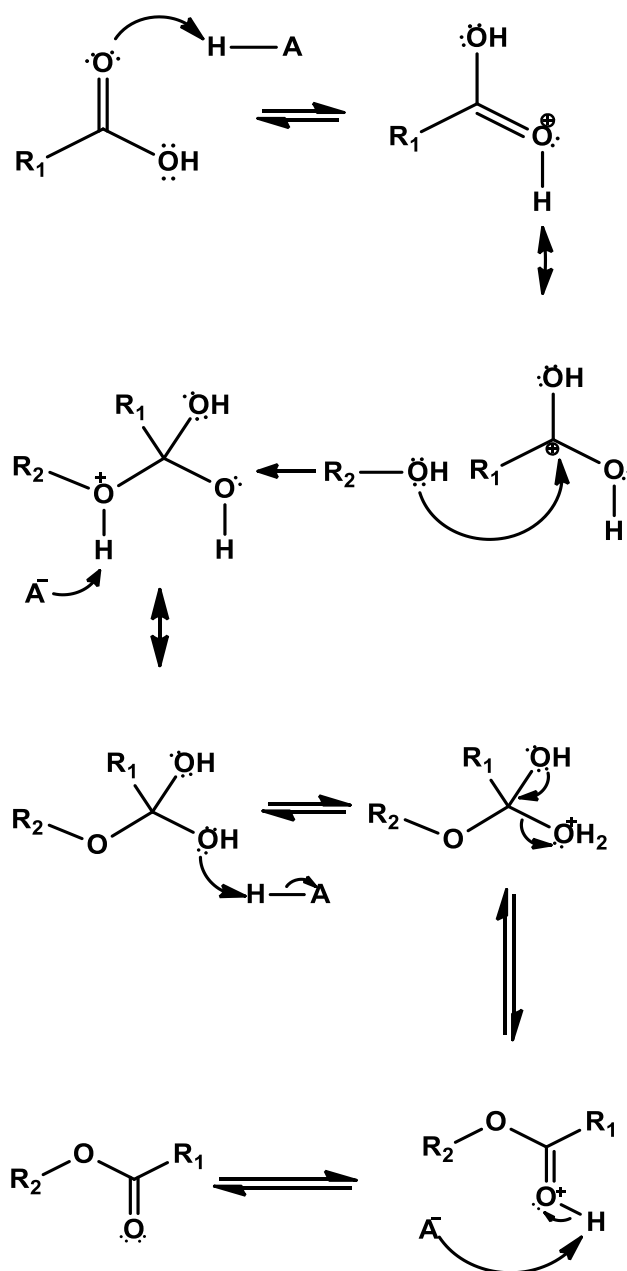


FIGURA 3. MECANISMO SUGERIDO PARA A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM MEIO ÁCIDO.

FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS (1997).

1.3.1.2. Transesterificação em meio ácido

Os ácidos de Brønsted-Lowry (e.g., sulfúrico, sulfônico, fosfórico e clorídrico) podem ser utilizados na conversão de materiais graxos em biodiesel. Normalmente, este tipo de catálise é empregada quando altos teores de AGLs compõem a matéria-prima, pois esta característica atrapalha a eficiência dos catalisadores tradicionais básicos devido à formação de produtos saponificados (FIGURA 4) (CHESTERFIELD *et al.*, 2012). Usualmente, óleos e gorduras com estas características são considerados de baixa qualidade e, por isso, são menos dispendiosos (ARANSIOLA *et al.*, 2014).

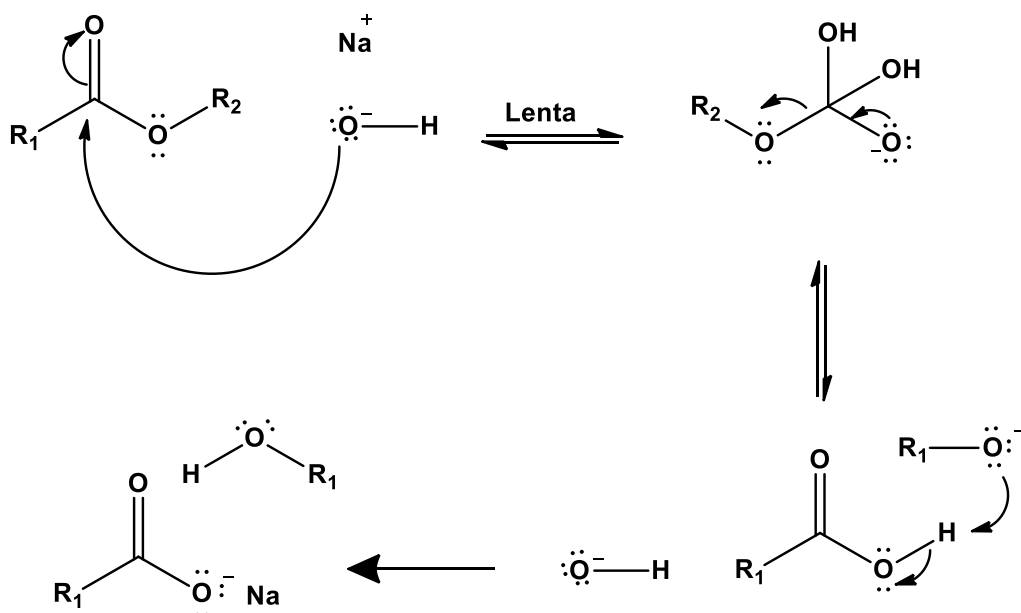


FIGURA 4. MECANISMO SUGERIDO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.
FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS (1997).

Conforme demonstrado na FIGURA 5, o mecanismo SN_1 de transesterificação homogênea em meio ácido ocorre primeiramente pela protonação do grupo carbonila do éster (TAG), levando à formação do carbocátion. Em um segundo momento, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico pelo álcool e forma um intermediário tetraédrico que, por sua vez, elimina uma molécula de éster alquílico e regenera o catalisador (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1997). Todavia, com altos teores de água, a reação de hidrólise também acontece e o ataque ao carbocátion ocorre pelo nucleófilo água, liberando AGLs no meio de reação.

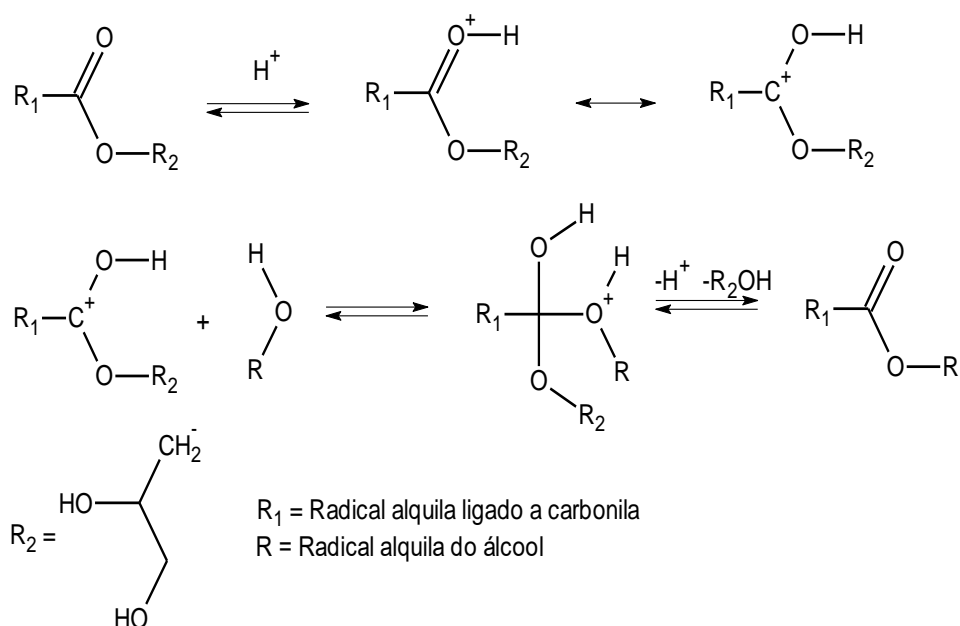


FIGURA 5. MECANISMO SUGERIDO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO HOMOGÊNEA CATALISADA POR ÁCIDO.

FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS (1997).

Como relatado, tanto os catalisadores homogêneos de caracteres básicos quanto os ácidos apresentam inconvenientes processuais. Dentre estes, destacam-se a impossibilidade de reutilizá-los e a dificuldade em purificar os ésteres alquílicos, isto porque estes são líquidos e de difícil recuperação. Além disso, os catalisadores supracitados geram muitos efluentes aquosos de difícil recuperação e reuso, que são provenientes das etapas de purificação dos ésteres graxos (ADACHI *et al.*, 2013; ARANSIOLA *et al.*, 2014; LISBOA *et al.*, 2014). Além disto, os catalisadores homogêneos de natureza ácida ainda são desvantajosos porque apresentam menores taxas de reação (400 vezes) em comparação aos catalisadores básicos, demandam maiores gastos de energia e são de difícil manipulação (AGUIEIRAS *et al.*, 2014). Assim, estes inconvenientes motivam a utilização dos catalisadores heterogêneos visando minimizar estes inconvenientes (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; ADACHI *et al.*, 2013).

1.3.2. Catalisadores heterogêneos

A utilização de catalisadores heterogêneos (sólidos) para a produção de biodiesel é uma prática que, além de outras vantagens, minimiza os problemas de purificação dos produtos obtidos nos processos tradicionais. Desta forma, o coproduto glicerina é recuperado com um grau menor de impurezas que podem

ser facilmente removidas, possibilitando o seu uso em indústrias farmacêuticas e alimentícias (DOMINGOS *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2014). Ademais, estes materiais permitem o dimensionamento de reatores contínuos que podem operar de modo contínuo; além disso, podem ser recuperados e reutilizados por diversas vezes, acarretando em uma maior viabilidade econômica ao processo (ARANSIOLA *et al.*, 2014).

Assim como na catálise homogênea, os catalisadores heterogêneos químicos mais testados para a produção de biodiesel possuem sítios catalíticos de Lewis ou Brönsted-Lowry e, portanto, também são de natureza ácida (e.g. zircônia sulfatada, zeólitas) ou básica (Al_2O_3 , óxidos alcalinos metálicos, hidrocalcitas)(CORDEIRO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

Em contrapartida aos catalisadores homogêneos de natureza ácida, a catálise heterogênea química ácida é menos corrosiva, menos tóxica e pouco sensível à presença de impurezas e AGLs na matéria-prima, além de gerar menos problemas ambientais. Entretanto, necessita de maiores temperaturas ($> 75\text{ }^\circ\text{C}$) e razões molares álcool:óleo. Além disso, estes catalisadores podem sofrer desativação por adsorção e ter baixa área superficial por unidade de volume, resultando em redução na sua atividade catalítica (ARANSIOLA *et al.*, 2014; CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE, 2014). Já para os catalisadores heterogêneos básicos, um dos principais problemas associados ao seu uso é a facilitada lixiviação das espécies cataliticamente ativas para o meio de reação, o que tornaria a catálise parcialmente homogênea (CORDEIRO *et al.*, 2011). Em vista disso, muitos aspectos devem ser avaliados no desenvolvimento de materiais catalíticos mais robustos e com maior aplicabilidade, como, por exemplo, fácil regeneração, alta estabilidade térmica, elevada resistência à fricção e seletividade à molécula de interesse (CORDEIRO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

Outros catalisadores heterogêneos, como enzimas imobilizadas em suporte polimérico, podem ser empregados na produção de biodiesel. Todavia, devido ao seu alto custo, os catalisadores químicos ainda são os mais empregados em processos industriais (ZHAO *et al.*, 2015).

1.4. Definição, características e aspectos relacionados à aplicação de lipases

As lipases, ou triacilglicerol hidrolases (EC. 3.1.1.3), atuam na hidrólise de triacilglicerídeos formados por ácidos graxos de cadeias curtas, médias ou longas. No entanto, para serem definidas como lipases, estas devem, necessariamente,

apresentar atividade contra triacilglicerídeos de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono). A reação de hidrólise ocorre em etapas, com formação de diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (FIGURA 6). Além disso, lipases podem ser empregadas como biocatalisadores em diversas reações de síntese orgânica em meios não aquosos, como esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e oximólise (ZAKS e KLIBANOV, 1985; JAEGER *et al.*, 1999; VILLENEUVE *et al.*, 2000; CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE, 2014).

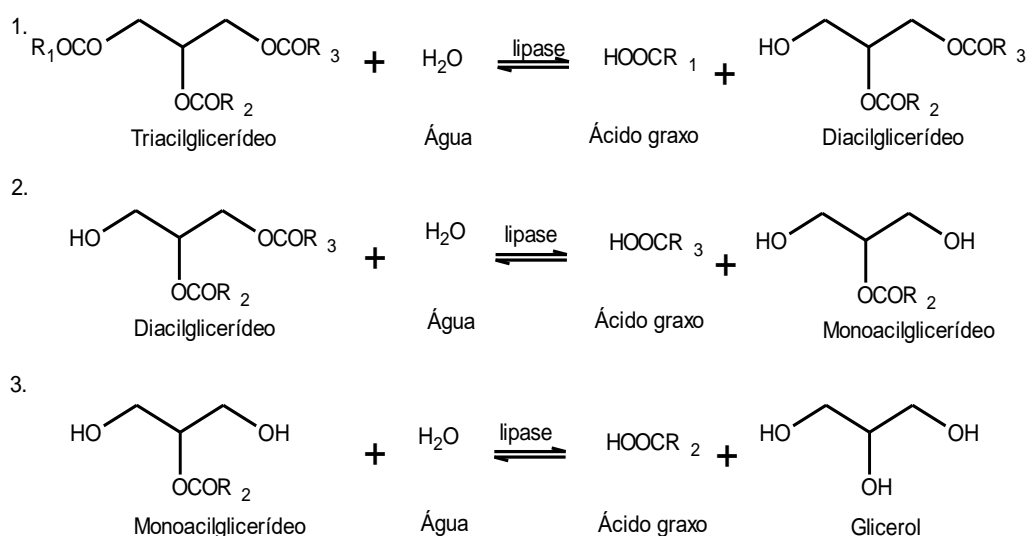


FIGURA 6. REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ACILGLICERÍDEOS ONDE R₁, R₂ E R₃ SÃO CADEIAS ALQUILICAS.

FONTE: CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE (2014).

A faixa de massa molecular das lipases é de 19-60 kDa e estas podem ser obtidas de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), plantas (e.g., látex do mamão e sementes de colza, aveia e mamona) e de animais (e.g., lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas). Embora suas fontes sejam diversificadas, as lipases mais utilizadas industrialmente são oriundas de fungos e bactérias, pois o cultivo de micro-organismos permite a obtenção regular e abundante destas enzimas por ser independente de flutuações sazonais de produção e por apresentar alta produtividade, respectivamente. Além disso, a manipulação genética de micro-organismos, com vistas ao melhoramento das propriedades da enzima, é mais fácil quando comparada com outras fontes e lipases microbianas podem atuar sobre uma grande gama de substratos, em

faixas abrangentes de pH e de temperatura (VILLENEUVE *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2006; AARTHY *et al.*, 2014).

Quanto a sua estrutura, lipases apresentam um padrão conformacional de α/β hidrolases, com dobras similares no seu núcleo central de sete fitas β paralelas e uma antiparalela que são conectadas por seis α -hélices. ; Estas α -hélices são representadas pelos cilindros e as folhas β pelas setas planas (FIGURA 7). Além disso, os pontos preenchidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo: serina (Ser, resíduo nucleofílico), histidina (His) e aspartato ou glutamato (Asp/Glu, resíduo ácido), que é a configuração de tríade catalítica análoga a todas as lipases (UPPENBERG *et al.*, 1994; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

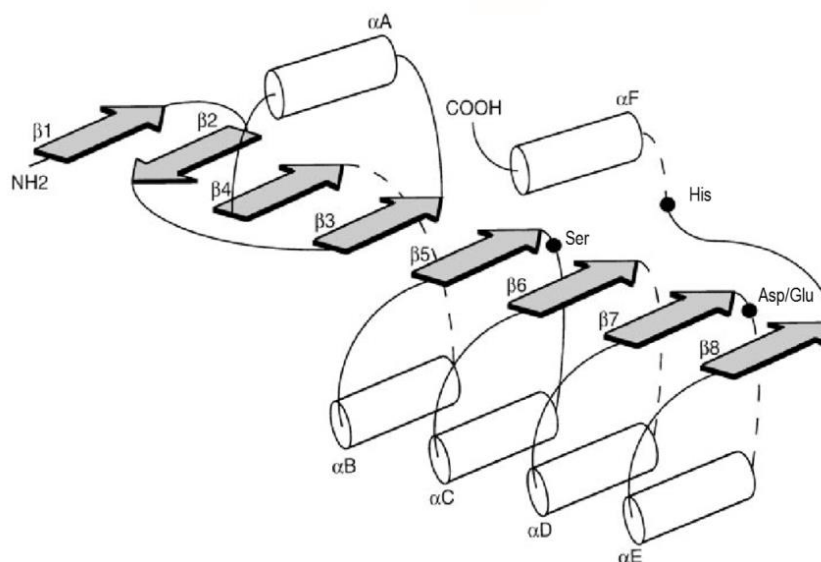


FIGURA 7. MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES.

FONTE: Adaptado de JAEGER, DIJKSTRA e REETZ (1999).

As posições topológicas dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico diferenciam-se dentre diferentes classes de enzimas. Nas lipases, a existência de uma tampa constituída por no máximo duas α -hélices em alça (ou *loop*) com resíduos hidrofóbicos protege o sítio catalítico e determina a facilidade com que o substrato poderá acessá-lo (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). O processo de abertura desta tampa é acionado quando a lipase entra em contato com o substrato hidrofóbico, ocasionando o fenômeno denominado de “ativação interfacial”, que gera um rearranjo estrutural e a exposição do bolsão hidrofóbico,

ação que aumenta a atividade enzimática uma vez que o sítio ativo fica mais acessível aos substratos (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Porém, não há evidência para a ocorrência deste fenômeno em algumas lipases, como é o caso da CALB (FIGURA 8), que em ensaios de cristalografia demonstrou assumir uma conformação aberta ativa com um canal hidrofóbico exposto ao acesso dos reagentes presentes no meio de reação (UPPENBERG *et al.*, 1994).

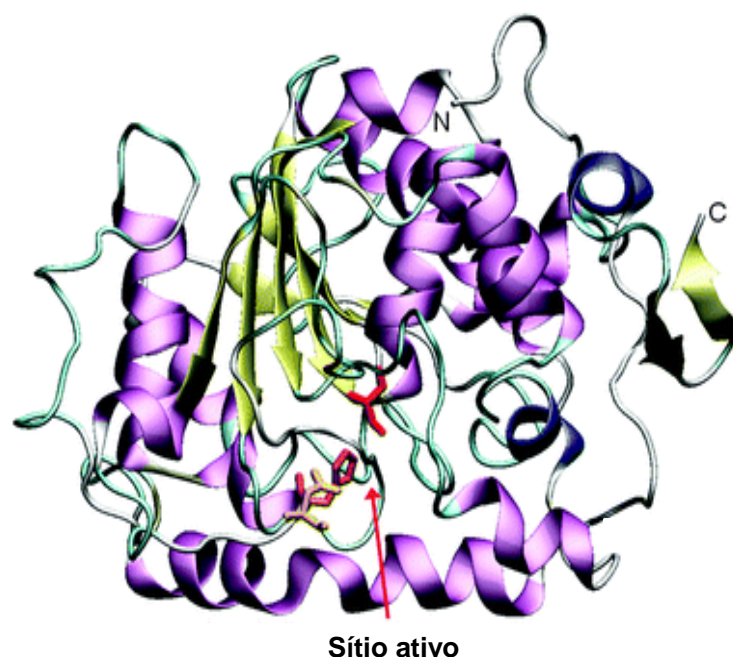


FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO EM FITAS DA LIPASE DE *Candida antarctica* B COM ENFÂSE NA SUA TRIÁDE CATALÍTICA.

FONTE: Adaptado de IUBMB (2015).

Como já relatado anteriormente, as lipases, quando em contato com o seu substrato, atuam na interface formada entre óleo e água catalisando as reações de hidrólise (UPPENBERG *et al.*, 1994). O mecanismo de hidrólise enzimática (FIGURA 9) ocorre em duas etapas: inicialmente a interação do resíduo negativamente carregado de aspartato (ou glutamato) remove um próton do resíduo de histidina, e esta, por sua vez, atua como uma base capturando um próton da hidroxila do resíduo de serina, o que confere a este resíduo de aminoácido um caráter básico e nucleofílico. Em seguida, o íon alcóxido gerado no resíduo de serina ataca a carbonila do substrato e forma um intermediário tetraédrico (oxiânion). Este por sua vez, se estabiliza a partir da formação de ligações de hidrogênio com os grupamentos amida entre os resíduos de aminoácidos específicos. Após esta etapa, o complexo acil-enzima é formado

pela liberação do álcool e a ligação do grupamento acila do substrato. Na segunda etapa, o ciclo é repetido, onde o nucleófilo água ataca o complexo acil-enzima, liberando um ácido graxo e regenerando o sítio ativo da enzima (JAEGER *et al.*, 1994).

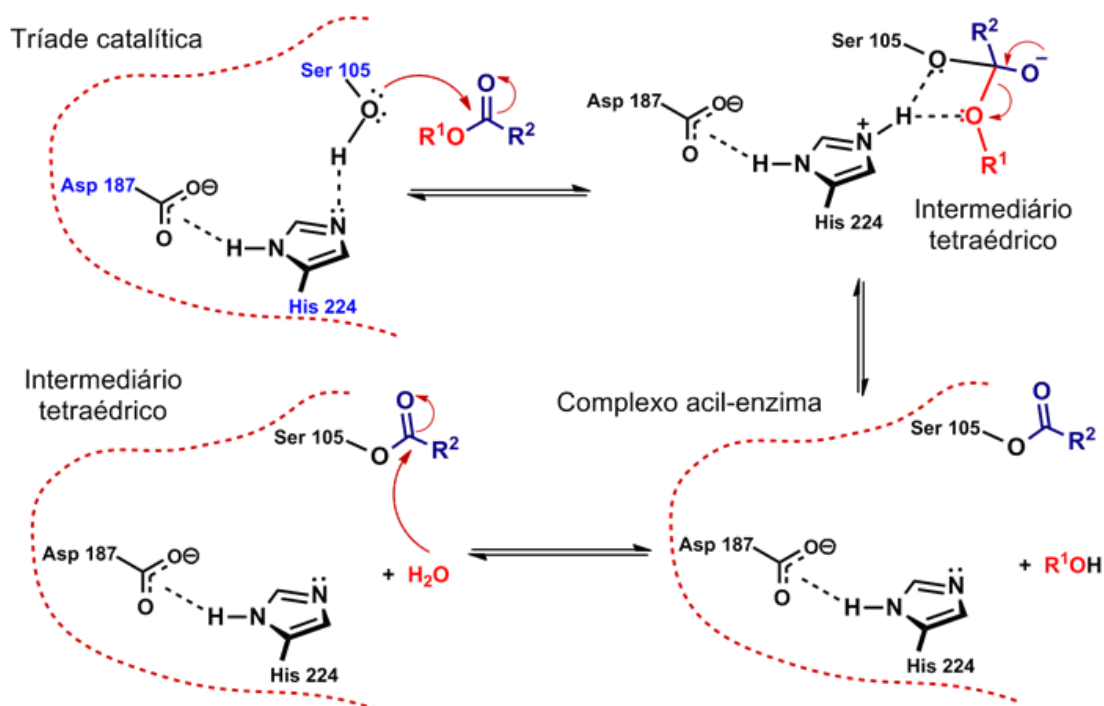


FIGURA 9. MECANISMO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÍDEOS CATALISADO POR LIPASES.

FONTE: Adaptado por SILVA (2011) de JAEGER, DIJKSTRA e REETZ (1999).

Com a mudança da água por outro nucleófilo (FIGURA 9) ou com a diminuição do teor de água no meio de reação, as lipases podem catalisar diversas reações em síntese orgânica. Por outro lado, o emprego destas enzimas em processos catalíticos pode ser realizado em duas formas: no seu estado livre (e.g. Callera™ Trans L, lipase de *Thermomyces lanuginosus*) ou imobilizadas em um suporte inerte (Novozymes® 435). O uso de lipases livres elimina o custo adicional do processo de imobilização, acarretando em redução no custo do catalisador (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; PERDERSEN *et al.*, 2014). Entretanto, meios orgânicos podem levar à formação de aglomerados de proteínas que causam dificuldades de acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas, diminuindo consideravelmente a sua atividade catalítica. Além disso, a presença da água proveniente da solução enzimática pode deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação de síntese para a reação de hidrólise. Lipases livres

também são mais sensíveis às condições de reação (temperatura e solventes) e as etapas de recuperação e reuso da enzima são dificultadas. Por outro lado, o processo de imobilização pode melhorar a estabilidade das enzimas e facilitar a sua remoção do meio (NIELSEN *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2014; VERMA, AZMI e KANWAR, 2008).

PEDERSEN *et al.* (2014) avaliaram a produção de biodiesel pela etanólise do óleo de canola empregando como catalisador a enzima livre comercial Callera Trans L[®] (lipase de *Thermomyces lanuginosus*). Os autores obtiveram conversões em ésteres etílicos de 98% em um tempo reacional de 23,3 h nas condições de excesso de etanol de 50% (razão molar 4,5:1) e 20% de água em relação ao óleo. Embora estes resultados demonstrem o uso de lipases livres em ambientes aquoestrictos, estudos de reutilização não foram realizados, o que demonstra a necessidade de melhoria do processo. Por isso, o uso de lipases imobilizadas ainda é mais vantajoso porque a sua atividade pode ser regenerada e recuperada com uma simples filtração (ARAÚJO *et al.*, 2013; ZHANG, HE e ZHUO, 2013).

O processo de imobilização visa fixar enzimas em um suporte sólido preferencialmente através de um método que garanta a manutenção de suas propriedades catalíticas. Como vantagens, a imobilização facilita a recuperação do biocatalisador do meio reacional, o que permite a sua utilização por diversas vezes e repercute em uma maior viabilidade econômica para o processo. Além disso, a imobilização pode aumentar a estabilidade térmica e a atividade catalítica da enzima devido à interação desta com o suporte, que pode proporcionar modificações no ambiente de contato com o substrato e altera a sua estrutura tridimensional. Entretanto, o processo de imobilização pode ocasionar em limitações difusionais e, quando realizado de forma ineficiente, pode causar perda ou diminuição de atividade catalítica (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006).

1.4.1. Utilização de lipases na síntese de ésteres alquílicos

As propriedades das lipases, como especificidade e seletividade, podem reduzir os custos de purificação do produto de interesse visto que agem apenas sobre o seu substrato, minimizando a geração de resíduos. Adicionalmente, outras vantagens podem ser notadas na utilização de lipases na síntese de biodiesel, uma vez que algumas lipases apresentam estabilidade nestes meios de reação, possibilitando o seu uso em reações de alcóolise que necessitam do

emprego de solventes para dissolução dos materiais graxos (ZAKS e KLIBANOV, 1985; JAEGER e REETZ, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Todavia, em comparação com o processo químico de síntese do biodiesel, ainda há a necessidade de otimização do processo de catálise enzimática, visando a diminuição dos tempos reacionais, a recuperação e manutenção da atividade enzimática por vários ciclos reacionais e o uso de sistemas livres de solvente. Além disso, é necessário a otimização dos processos de produção e imobilização de lipases para diminuir seu custo e tornar este biocatalisador mais competitivo economicamente (BAJAJ *et al.*, 2010).

O desempenho de diversas lipases já foi avaliada para a síntese de biodiesel, como é o caso da lipase de *Candida antarctica* B. A lipase de *C. antarctica* pode ser encontrada em suas duas isoformas denominadas de A e B, diferindo em seus pontos isoelétricos, massas moleculares, faixas de pH e de temperatura de reação ótima (UPPENBERG, 1994). Devido as suas diferentes características de especificidade e seletividade, a lipase de *Candida antarctica* B é a mais empregada em diversas reações. A forma imobilizada desta lipase é comercialmente denominada como Novozym 435 (YADAV e DEVI, 2004). A enzima CALB é produzida a partir de cepas recombinantes de *Aspergillus niger* para depois ser purificada e imobilizada em resina acrílica de troca iônica (Lewatit OC VP 1600). Esta resina apresenta propriedades como tamanho de partícula na faixa de 315-1000 μm , área superficial de 130 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ e diâmetro médio de poros de 150 Å (NES, 2011).

A produção de ésteres alquílicos empregando a lipase Novozym 435 já foi estudada em alguns trabalhos. Por exemplo, KÖSE, TÜTER e AKSOY (2002) realizaram a metanólise do óleo de algodão e obtiveram conversões de 91,5% nas condições de razão molar metanol:óleo de 4:1, 30% de N435 em relação à massa do óleo, 50 °C e 7 h de reação em um sistema livre de solvente.

MACEIRAS *et al.* (2008) avaliaram o efeito das variáveis razão molar, quantidade de enzima e tempo reacional na conversão do óleo residual de fritura. As condições que resultaram na melhor resposta em conteúdo de ésteres metílicos (89,1%) envolveram o uso de razão molar metanol:óleo de 25:1 e 10% de N435 em relação à massa do óleo por 4 h de reação a 50 °C.

O efeito da mistura de metanol e etanol na alcóolise do óleo de soja foi estudada por ZHAO *et al.* (2014). Estes autores utilizaram esta estratégia com o

intuito de aproveitar as principais propriedades dos dois álcoois, já que o metanol é mais reativo do que o etanol, o que garantiria elevadas conversões de equilíbrio, enquanto que o etanol teria menor impacto na atividade catalítica da enzima. Os autores concluíram que misturas de até 60% de metanol ao etanol são toleráveis à enzima; todavia, em ensaios com menores proporções deste álcool, as conversões aumentaram linearmente. Diversos autores já relataram a utilização da N435 como catalisador em reações de síntese de ésteres etílicos, em sistemas livres de solvente e em processos em batelada (TABELA 1). Ressaltam-se os trabalhos de Cerveró, Álvarez e Luque (2014), que estudaram a transesterificação do óleo de soja com etanol na presença da lipase N435 e conseguiram rendimentos de aproximadamente 70% em 10 h de reação, nas condições de 5% de enzima (m m^{-1}) e razão molar de etanol:óleo 3:1, a 37 °C. Além disso, os autores avaliaram a adição de etanol em duas e três etapas e observaram um rendimento de cerca de 100% em 20 h de reação, enquanto que, sem a adição sequencial do etanol, o mesmo rendimento foi obtido em 48 h. Assim, nota-se a eficiência destes biocatalisadores na produção de ésteres etílicos de ácidos graxos e, portanto, otimizações de processo devem ser realizadas visando sua maior viabilidade econômica.

TABELA 1. TRABALHOS RECENTES SOBRE REAÇÕES CATALISADAS PELA LIPASE NOVOZYM 435 NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS.

Matéria-prima	Reação Catalisada	Melhores condições	Conversão	Tempo (h)	Referência
Óleo de soja refinado	Etanólise	RM 3:1, 5% de N435 (m m^{-1} de óleo) e 37 °C	80%	15	Cerveró <i>et al.</i> (2014)
Óleo de coco	Etanólise	RM 10:1, 7% de N435 (m m^{-1}), 60 °C e 200 rpm	80,5%	24	Ribeiro <i>et al.</i> (2012)
Óleo de soja refinado	Etanólise	Ultrassom, RM 3:1, 70 °C e 52,8 W	87,9%	4	Zanatta e Dalla Rosa (2014)
Óleo de soja refinado	Etanólise	RM 51:1, 5% de N435 (m m^{-1}), 32 °C e 130 rpm	82,9%	24	Rosset <i>et al.</i> (2011)
Óleo de soja refinado	(M)etanólise	5% de N435 (m m^{-1}); RM EtOH, MeOH:óleo 3,0:1; E 2,4 M 0,6:1, E 1,8 M 1,2:1 e E 1,2 M 1,8:1, 30 °C e 300 rpm	82%	12	Zhao <i>et al.</i> (2014)
Borra ácida	Etanólise	RM 3:1, 5% de N435 (m m^{-1}), 50 °C e 180 rpm	95%	21	Wang <i>et al.</i> (2011)

RM: Razão molar;
N435: Lipase Novozym 435;
MeOH (M): Metanol;
EtOH (E): Etanol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir ésteres etílicos via catálise enzimática a partir de óleos residuais utilizando a lipase imobilizada comercial Novozym 435 em sistemas livres de solvente.

2.2. Objetivos específicos

1. Pré-otimizar a etanólise do óleo residual de fritura em meio heterogêneo, utilizando a lipase imobilizada N435 em sistema de batelada;
2. Avaliar a influência do tratamento com diferentes solventes na manutenção da atividade catalítica da lipase e realizar estudos de reuso do biocatalisador nas condições otimizadas a partir do item I;
3. Investigar a influência da presença de compostos de degradação do óleo residual de fritura na atividade da lipase N435;
4. Caracterizar o produto obtido no ponto de maior rendimento do planejamento fatorial (item I) de acordo com as principais especificações contidas na Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis nº 45/2014.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A lipase comercial Novozym® 435 (N435) foi fornecida pela Novozymes Latin America Ltda. (Araucária, PR). O óleo residual de fritura (ORF) foi proveniente da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o óleo refinado de soja (OS) (Leve®, Araucária-PR) foi obtido no comércio local. Os demais reagentes, gases e padrões cromatográficos foram adquiridos conforme as especificações das metodologias em que foram utilizados.

2.2. Metodologia experimental

2.2.1. Caracterização de parâmetros físicos e químicos da matéria graxa

Os principais parâmetros físicos e químicos do óleo de soja e do ORF foram determinados segundo as metodologias estabelecidas pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2003) que estão listadas na TABELA 2.

TABELA 2. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS AVALIADOS PARA O ÓLEO DE SOJA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF).

Parâmetro	Norma
Teor de acidez ^a	Ca 5a-40
Índice de saponificação ^b	Cd 3-25
Teor de água ^c	Ca 2e-84
Massa molar ^d	Cd 3-25
Índice de iodo ^e	Cd 1-25
Índice de peróxido ^f	Cd 8b-90

^a Quantidade de NaOH, em mg, que é necessária para neutralizar 1 g de amostra, convertida em percentual de ácido oleico livre;

^b Quantidade de KOH, em mg, requerida para saponificar 1 g de amostra;

^c Percentual mássico de água (% m m⁻¹);

^d Valor obtido através do índice de saponificação que permite calcular a MM do ORF;

^e Centigramas de iodo requeridas por 1 g de amostra;

^f Determinação em termos de meq de peróxido por kg de amostra que oxidam o KI.

2.2.1.1. Teor de acidez

A determinação do teor de acidez do óleo de soja, óleo residual de fritura e dos produtos foi realizada em erlenmeyer de 125 mL com aproximadamente 0,6 g de amostra, que foi dissolvida em 20 mL de éter etílico:etanol (2:1 v v⁻¹) e

titulada com uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio previamente padronizada com biftalato de potássio (C₈H₅KO₄, mín. 99,5%). A equação 2 foi utilizada para o cálculo:

$$\% \text{ acidez} = \frac{MA \cdot V \cdot C}{m} \quad \text{Equação 2.}$$

onde **MA** representa a massa molar do ácido oleico dividida por 10, **V** representa o volume da solução titulante de NaOH gasto na titulação (L), **C** é a concentração molar da solução de NaOH e **m** é a massa de amostra pesada para a análise.

2.2.1.2. Índice de Saponificação e Massa molar

O índice de saponificação (I.S.) foi utilizado para a determinação da quantidade da matéria graxa que é passível de conversão em monóesteres, tanto por reações de esterificação quanto de transesterificação. Esta análise foi realizada a partir da pesagem de 2,0 g de amostra em balão de fundo redondo (250 mL), os quais foram solubilizados em 25 mL de uma solução etanólica a 0,5 mol L⁻¹ de hidróxido de potássio, sendo que esta mistura foi aquecida em manta de aquecimento por 30 min, sem agitação e em um sistema de refluxo. Ao final, o excesso de base das amostras foi titulada com uma solução previamente padronizada de ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹. Além disso, esta metodologia também foi adotada para o cálculo da massa molar média (MM) do ORF, conforme descrita na EQUAÇÃO 1.

$$I.S = \frac{3 \cdot 56 \cdot 10^3}{m} \quad \text{Equação 1.}$$

onde **I.S.** significa índice de saponificação e **m** representa a massa molar média do triacilglicerídeo (KNOTHE, 2002). O valor obtido foi então empregado para obtenção das relações estequiométricas nos estudos posteriores.

2.2.1.3. Teor de água

A determinação do teor de umidade dos materiais graxos foi realizada em um titulador Karl Fisher KEM EBU-610-KF no módulo coulométrico (10 µg -100

mg H₂O), equipado com corrente alternada polarizada e eletrodo duplo de platina.

2.2.1.4. Índice de iodo

O índice de iodo foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL onde se pesou 0,22 g de amostra, que foi totalmente dissolvida em 15 mL de tetracloreto de carbono. Em seguida, dispensou-se neste frasco 25 mL de uma solução de Wijs (Iodo Cloro) e este foi imediatamente tampado e colocado em um ambiente escuro, permanecendo por 30 min. Após esta etapa, o Erlenmeyer foi retirado do lugar ausente de luz e adicionou-se 20 mL de uma solução de KI saturada e 100 mL de água deionizada a esta mistura. A amostra foi titulada com uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de tiossulfato de sódio, tendo uma solução de amido como indicador. O cálculo do índice de iodo foi realizado conforme a EQUAÇÃO 3.

$$\text{Índice de iodo} = 100 \frac{253,81 \cdot db}{MM} \quad \text{Equação 3.}$$

onde **db** é o número de ligações duplas, **MM** é a massa molar do componente graxo e **253,81** g mol⁻¹ é a massa de dois átomos de iodo que são teoricamente adicionados à amostra.

2.2.1.5. Índice de peróxido

O índice de peróxidos da amostra foi determinado em um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g da amostra totalmente solubilizadas em 30 mL de uma mistura de ácido acético glacial: clorofórmio (3:2 v v⁻¹). Posteriormente, 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio foram adicionados a este meio de reação, que foi selado e agitado por 1 min. Após esta etapa, 30 mL de água deionizada foram adicionados e esta mistura foi titulada com uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de tiossulfato de sódio até o ponto de equivalência, que foi notado pela presença de amido como indicador.

2.2.1.6. Análise dos produtos de degradação do óleo residual de fritura

A determinação qualitativa dos produtos de degradação da matéria graxa foi realizada em espectrômetro de massas Varian do tipo triplo quadrupolo, modelo 320-MS. A infusão direta da amostra, previamente solubilizada em

acetonitrila, foi realizada por uma bomba seringa que operou em uma velocidade de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. A fonte de ionização por eletrospray (45 °C) foi operada no modo positivo e a voltagem do capilar foi de 5400 V com um potencial 70 eV. O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás de nebulização foi produzido por um gerador de nitrogênio da marca ESA, modelo N2-4000-L1252. O registro de dados foi realizado a partir da média de 9 espectros de massas que foram adquiridos na faixa de 800 a 2000 Daltons. O programa MS Workstation foi utilizado para a aquisição dos espectros.

2.2.1.7. Determinação quantitativa dos componentes de degradação

A análise percentual dos componentes de alta massa molar do ORF foi realizada por cromatografia de permeação em gel, nas condições especificadas no item 3.2.13. O cálculo dos componentes de degradação foi realizado segundo a EQUAÇÃO 4 baseada na norma AOCS Cd22-91:

$$POT = \frac{A_{OT}}{\sum A} \times 100 \quad \text{Equação 4.}$$

onde POT corresponde ao conteúdo de oligômeros de triacilglicerídeo (% $A A^{-1}$), A_{OT} representa a soma das áreas dos picos dos oligômeros e $\sum A$ é a soma das áreas de todos os picos do cromatograma. Com base nestes dados, todos os cálculos de conversão (m m^{-1}) foram realizados a partir de um fator de correção para o material passível de transesterificação. Isto foi realizado a partir da preparação de uma curva de calibração do padrão externo trioleína, onde, através da integração do pico correspondente aos triacilglicerídeos, determinou-se o percentual mássico da amostra que era passível de conversão.

2.2.1.8. Determinação do perfil cromatográfico da matéria-prima

As composições químicas do OS e do ORF, obtidas através da conversão destas matérias graxas em seus respectivos ésteres metílicos, foram determinadas segundo a metodologia descrita por HARTMAN e LAGO (1973) e adaptada para uso em microescala por MENEZES *et al.* (2013). Primeiramente, preparou-se uma solução esterificante a partir de 60 mL de metanol e 2 g de cloreto de amônio, que foi agitada durante 5 min. Em seguida, 3,0 mL de ácido sulfúrico foram adicionados à mistura que foi agitada até a total dissolução do sal.

Como parte do procedimento, pesou-se aproximadamente 200 mg da amostra em um tubo de ensaio e posteriormente adicionou-se 3,0 mL de uma solução 0,5 mol de NaOH em 1,0 L de metanol. Os tubos de ensaio foram tampados e esta mistura foi aquecida em banho-maria a 90 °C por 10 min para favorecimento da reação de saponificação. Após o resfriamento, adicionou-se 9,0 mL da solução esterificante e a reação prosseguiu por 10 min a 90 °C. A mistura foi resfriada e a esta se adicionou 5,0 mL de *n*-heptano para separação de fases e recuperação da fração lipídica. Após esta etapa, acrescentou-se 5,0 mL de água deionizada para que ocorresse a total separação dos produtos. As amostras foram secas a vácuo em dessecador durante 48 h. A análise do perfil dos ésteres obtidos foi feita por cromatografia de fase gasosa nas condições descritas no item 3.2.13.

2.2.2. Determinação da atividade de esterificação em meio orgânico

Uma reação padronizada de síntese de ésteres etílicos foi utilizada para determinar a atividade de esterificação da lipase N435, utilizando-se o ácido oleico como padrão na síntese do oleato de etila. As reações foram realizadas em agitador orbital com Erlenmeyers de 25,0 mL, contendo 5,0 mL heptano, 20 mg de enzima imobilizada, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol L⁻¹ de etanol a 40 °C e 200 rpm. Alíquotas de 100 µL foram recolhidas do meio de reação e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual produzido por unidade de tempo (min), através do método de Lowry e Tinsley (1976). Este método foi utilizado para quantificação indireta do teor de ésteres formados. Tal metodologia consiste em solubilizar a amostra em *n*-hexano, adicionando uma solução de acetato cúprico como reagente colorimétrico e obtendo-se um complexo entre os íons Cu⁺² e os ácidos graxos livres. A amostra retirada do meio de reação foi adicionada ao tubo Eppendorf que continha o agente colorimétrico e *n*-hexano. Posteriormente, estes frascos foram agitados por 40 s e a cor do complexo formado foi lida em espectrofotômetro UV/Vis (Varian®, modelo CARY 100 Scan) no comprimento de onda de 715 nm. Assim, uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a síntese de 1 µmol de éster por unidade de tempo, nas condições do experimento.

2.2.3. Determinação da atividade de hidrólise em pHStat

A liberação de ácidos graxos a partir da ação hidrolítica da lipase foi determinada por titulometria com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em um titulador automático do tipo pHStat (Metrohn 718 Stat Titrino). Uma emulsão com

goma arábica foi preparada (3%, m v⁻¹) contendo CaCl₂.2H₂O (2 mmol L⁻¹), tampão Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 8,0) e NaCl (150 mmol L⁻¹) (TISS *et al.*, 2001) e a esta emulsão foi adicionado o substrato trioleína (62 mmol L⁻¹). Esta mistura foi homogeneizada por 15 min em liquidificador. Uma quantidade de 100 mg da enzima foi adicionada em 20 mL de emulsão no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) sob agitação magnética (300 rpm) a 40 °C, pH 7,0 (GLOGAUER *et al.*, 2011) e a reação foi monitorada durante 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min, nas condições do ensaio.

2.2.4. Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico

O ensaio que tem como finalidade a determinação da atividade hidrolítica da enzima em meio orgânico foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de meio reacional e aproximadamente 20 mg da enzima imobilizada. O meio reacional foi constituído de 4,9 mL de heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 0,1 mL (2% v v⁻¹) de água destilada, sendo que os ensaios foram realizados a 200 rpm e 40 °C. Alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional em intervalos previamente fixados e o método de Lowry-Tinsley (vide item 3.2.2) foi empregado para determinação do teor de ácido graxo residual. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 µmol min⁻¹ de ácidos graxos (ALNOCH, 2013).

2.2.5. Estudos preliminares de etanólise do óleo residual de fritura

As reações de etanólise foram realizadas sob agitação orbital em frascos Erlenmeyer de 125 mL hermeticamente selados a 40 °C e 150 rpm. A massa do ORF foi mantida constante (15 mmol ou 13,47 g) para todos os experimentos e os demais parâmetros foram ajustados em relação a este substrato. A cinética da reação foi acompanhada por alíquotas de amostra retiradas dos frascos em intervalos regulares.

A condição inicial de todos os parâmetros foi escolhida a partir do trabalho de Chen *et al.* (2009), que propuseram o uso de razão molar etanol:óleo de 3:1, 5% de biocatalisador (m m⁻¹) e 10% de *n*-hexano em relação à massa do óleo a 40 °C e 150 rpm. Nestas condições, foram avaliados o efeito da adição de

solvente (10% de *n*-hexano m m^{-1}), da quantidade de biocatalisador (2, 3, 4 e 5% m m^{-1} do ORF) e da razão molar etanol:óleo (3:1, 4:1, 6:1 e 9:1). Após cada experimento, a combinação dos parâmetros que resultou em maior conversão foi utilizada como referência para as etapas subsequentes do trabalho.

Além destes parâmetros, avaliou-se a influência do teor de água na conversão a ésteres etílicos. Para tanto, o ORF foi seco a 90 °C sob agitação magnética em uma chapa de aquecimento durante 2 h. Posteriormente, as seguintes proporções de água foram adicionadas ao óleo previamente seco (0% de água medida em Karl Fischer): 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,5% e 3,7% (m m^{-1}). Em paralelo a isto, também avaliou-se a possibilidade de utilização de etanol hidratado (95% v v^{-1}). Concomitante a estas adições, realizou-se um experimento com o ORF. O teor de água presente no óleo foi confirmado a partir de análises de Karl Fischer (vide item 3.2.1).

2.2.6. Pré-otimização multivariada da produção de ésteres etílicos

O planejamento experimental multivariado avaliou o efeito da razão molar etanol:óleo e da presença de água, de ácidos graxos livres (AGL) e de enzima nos níveis apresentados na TABELA 3. O teor de AGL foi ajustado a partir da adição de um padrão de ácido oleico em relação ao ORF (m m^{-1}). Os demais reagentes foram adicionados conforme as combinações estabelecidas no planejamento experimental. O tempo reacional foi fixado em 8 h. Posteriormente a isto, realizou-se um planejamento composto central de $3^{(4-1)}$ com 4 pontos centrais (TABELA 4).

TABELA 3. VARIÁVEIS INDEPENDENTES AVALIADAS EM TRÊS NÍVEIS PELO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Enzima ^a	1	3	5
Razão molar ^b	3:1	6:1	9:1
Água ^c	0,84	1,74	2,34
AGL ^d	10	15	20

^a Percentual mássico de biocatalisador por massa de ORF;

^b Razão molar de Etanol:ORF;

^c Quantidade de água por massa (g) de ORF;

^d Percentual mássico de ácido graxo livre adicionado por massa de ORF.

TABELA 4. COMBINAÇÕES DE VARIÁVEIS DEFINIDAS PELO SOFTWARE STATISTICA 10.0.

Experimento	N435 ^a	Razão molar ^b	Água ^c	AGL ^d
1	3	3:1	0,84	20
2	3	9:1	1,74	20
3 ^{p.c.}	3	6:1	1,74	15
4 ^{p.c.}	3	6:1	1,74	15
5	5	3:1	0,84	15
6	1	6:1	0,84	20
7	1	9:1	0,84	15
8	5	9:1	1,74	15
9	5	9:1	2,34	10
10	3	6:1	0,84	15
11	5	3:1	1,74	10
12	5	6:1	2,34	15
13	1	3:1	1,74	20
14	3	3:1	2,34	10
15	5	9:1	0,84	20
16	3	9:1	2,34	15
17 ^{p.c.}	3	6:1	1,74	15
18	3	6:1	1,74	10
19	1	6:1	2,34	10
20	1	6:1	1,74	15
21	5	3:1	2,34	20
22	1	9:1	2,34	20
23	1	3:1	2,34	15
24	3	6:1	2,34	20
25 ^{p.c.}	3	6:1	1,74	15
26	5	6:1	0,84	10
27	1	3:1	0,84	10
28	1	9:1	1,74	10
29	3	3:1	1,74	15
30	3	9:1	0,84	10
31	5	6:1	1,74	20

^a Percentual mássico de biocatalisador por massa de ORF;^b Razão molar de etanol:ORF;^c Quantidade de água por massa de ORF;^d Percentual mássico de ácido graxo livre adicionado por massa de ORF;^{p.c.} Ponto central do planejamento experimental.

A conversão total foi determinada por CPG e a conversão relativa à reação de esterificação foi calculada a partir da variação do índice de acidez

(método AOCS Ca 5a - 40) do meio antes e após a reação de etanólise, permitindo assim o cálculo indireto da conversão relativa à transesterificação. Posteriormente, o meio de reação foi filtrado para a remoção do catalisador e o etanol foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 70 °C. A camada rica em ésteres etílicos foi analisada por cromatografia de permeação em gel (CPG), conforme descrito no item 3.2.13.

2.2.7. Ajuste das condições da etanólise do óleo residual de fritura em frascos agitados

Após a avaliação dos efeitos de água e AGL (item 3.2.6) e análise estatística deste planejamento, um novo planejamento experimental foi realizado visando-se o ajuste final do processo de produção de ésteres etílicos. Para tal, estudou-se o efeito das variáveis quantidade do biocatalisador N435 e razão molar (etanol:óleo) em tempos reacionais de 10 h, visto que estas representaram a maior influência positiva para a obtenção de ésteres etílicos. Deste modo, a otimização destas variáveis foi realizada a partir de um planejamento composto central (PCC). As combinações experimentais e seus respectivos níveis estão demonstrados na TABELA 5.

TABELA 5. COMBINAÇÃO DE NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.

Experimento	RM ^a	VC ^b	N435 ^b (%m m ⁻¹)	VC ^b
1	10,2:1	$+\sqrt{2}$	3	0
2	9:1	+1	1	-1
3	3:1	-1	1	-1
4	6:1	0	0,17	$-\sqrt{2}$
5	6:1	0	3	0
6	6:1	0	3	0
7	6:1	0	3	0
8	3:1	-1	5	+1
9	6:1	0	5,83	$+\sqrt{2}$
10	1,76:1	$-\sqrt{2}$	3	0
11	9:1	+1	5	+1

^a Razão molar de etanol:óleo utilizada para cada ponto experimental;

^b Valores codificados dos níveis estabelecidos para cada variável;

^c Percentual em gramas de biocatalisador por massa de óleo.

2.2.8. Análise de dados estatísticos dos estudos preliminares univariados e multivariados

O tratamento estatístico dos dados oriundos dos estudos preliminares (item 3.2.5.) foi realizado no programa GraphPad Prism 5 utilizando-se o teste de *Tukey* (nível de confiança de 95%). Já para a análise dos dados dos planejamentos multivariados, utilizou-se o programa STATISTICA 10.0, onde foram obtidas as superfícies de resposta, gráfico de Pareto e os dados de regressão múltipla (ANOVA).

2.2.9. Determinação dos níveis de adsorção de glicerol na lipase Novozym 435

O catalisador foi separado do meio reacional por filtração simples e, posteriormente, lavou-se 0,6735 g da lipase com 65 mL de água destilada durante 2 h sob agitação magnética. Em seguida, uma alíquota de 0,46 g do meio de reação foi lavada com 1 mL de água destilada e centrifugado a 10000 rpm ($11428,6 \times g$) durante 10 min. A determinação do glicerol aderido à enzima e presente na fração rica em éster após o término da reação foi realizada em um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detector modelo RID10A para índice de refração. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com fase móvel H_2SO_4 5 mM a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. A quantificação do glicerol foi efetuada por padronização externa, baseada em uma curva de calibração com sete pontos que se encontram na faixa de concentração de 2,4 a 0,037 mg mL⁻¹.

2.2.10. Ensaios de recuperação e reuso do biocatalisador

Ao término da reação de melhor condição do planejamento multivariado, o meio de reação foi filtrado a vácuo para a separação da lipase N435 e, posteriormente, lavagens distintas foram utilizadas para a remoção dos componentes adsorvidos no suporte do biocatalisador. Os tratamentos utilizados foram: *tert*-butanol seguido de água; mistura *tert*-butanol:água (1:1 v v⁻¹) aquecida a 40°C; mistura de *n*-hexano:etanol (1:1 v v⁻¹) e etanol. Como controle, as atividades de esterificação da enzima usada sem lavagem e a lipase comercial

não utilizada também foram medidas. Após esta etapa, a enzima foi deixada em estufa a 40 °C por 1 h e então, as atividades de esterificação em meio orgânico foram mensuradas conforme o item 3.2.2. Posteriormente, o melhor tratamento, ou seja, o que resultou na manutenção da maior atividade de esterificação foi selecionado para a realização dos ensaios de reuso do biocatalisador.

As reações de reuso da N435 foram realizadas nas condições de melhor resposta em EEAG do planejamento multivariado. Desta forma, após um ciclo reacional, a lipase foi filtrada a vácuo e lavada em etapas sequencias de dois solventes, primeiramente *terc*-butanol e depois água. Este biocatalisador recuperado foi deixado em estufa por 1 h e em seguida, reutilizado novamente nesta reação. Ademais, outro tratamento da lipase que utilizou apenas *terc*-butanol foi realizado e, posteriormente, esta enzima foi empregada na mesma reação de transesterificação e mediu-se o teor em ésteres etílicos (vide item 3.2.13).

2.2.11. Reações de transesterificação etílica em duas etapas sequenciais

As reações em duas etapas sequenciais foram realizadas com o objetivo de aumentar os teores em ésteres etílicos. Assim sendo, as condições selecionadas foram: 5% de enzima (m m^{-1}), razão molar de etanol:óleo 9:1 em 10 h de reação, a 40 °C e 150 rpm. Ao término desta etapa, o meio de reação foi filtrado para retirada do biocatalisador. A fração filtrada foi lavada exaustivamente com água (25 °C) em um funil de decantação e então rotaevaporada para garantir a total remoção do etanol. Em seguida, quatro estratégias foram utilizadas na segunda etapa, (i) mantendo-se as mesmas condições utilizadas na primeira etapa, (ii) reduzindo-se o excesso de etanol pela metade, (iii) utilizando-se a enzima fresca e (iv) aplicando-se enzima previamente recuperada como catalisadores desta reação.

2.2.12. Caracterização do produto final e ensaios de adição de antioxidantes

Posteriormente à obtenção das condições reacionais que levam ao produto de maior teor de ésteres etílicos, este material foi especificado segundo alguns parâmetros listados na Resolução nº 45/2014 da ANP e que, na atualidade, determinam os padrões de qualidade do biodiesel (TABELA 6).

A estabilidade oxidativa foi realizada segundo a metodologia EN14112 em

um equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, Herisau Switzerland). Para tal, envelheceu-se 3 g da amostra a 110 °C passando-se uma corrente de ar em um fluxo de 10 L h⁻¹. O ponto final foi determinado pela elevação na condutividade (tempo de indução) em um programa que acompanha o equipamento (Software 743 Rancimat, versão 1.0).

TABELA 6. PARÂMETROS E METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS.

Parâmetros	Método
Teor de éster (%)	EN 14103
Conteúdo de água (%)	AOCS Ca 2e-84
MAG, DAG, TAG ^a	EN14105
Estabilidade oxidativa a 110 °C	EN14112
Estabilidade oxidativa a 110 °C com DBPC ^b	EN14112
Índice de acidez	AOCS 5a-40
Índice de peróxido	AOCS Cd 8b-90

^a MAG, DAG, TAG – mono, di e triacilglicerídeos;

^b 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol;

Os ensaios de estabilidade oxidativa a 110 °C também foram realizados com a adição de DBPC (2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol) como aditivo antioxidante. Para tal, 1000 ppm de DBPC foram adicionados a 3 g de amostra e, posteriormente, estas foram induzidas à oxidação em um equipamento Rancimat, como descrito acima. A eficiência do antioxidante foi calculada através da EQUAÇÃO 5,

$$F = \frac{PI_x}{PI_o} \quad \text{Equação 5.}$$

onde PI_x corresponde ao período de indução da amostra sem antioxidante e PI_o é o período de indução na presença de antioxidante DBPC (FIGURA 10).

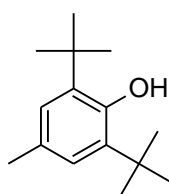


FIGURA 10. ESTRUTURA DO ANTIOXIDANTE 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol (DBPC).

2.2.13. Cromatografia de permeação em gel e cromatografia gasosa para análise dos ésteres alquílicos

A conversão de triacilglicerídeos em monoésteres foi avaliada em um cromatógrafo Waters® modelo 1515 com amostrador automático modelo 2707, pré-coluna Tosoh HXL-L e coluna Progel TSK (1000 e 2000 HXL, 30 cm x 7,8 mm) mantida a 45°C e eluída com tetraidrofurano a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. O volume das injeções foi de 20 µL para tempos de análise de 25 min e os componentes das amostras foram detectados por refratometria diferencial. A quantificação dos componentes foi realizada por calibração externa usando-se os seguintes padrões de referência: trioleína, dioleína, monoleína, estearato de etila (4,7%), linoleato de etila (36,2%), linolenato de etila (2,1%), oleato de etila (28,9%) e palmitato de etila (28,2%).

O perfil composicional em monoésteres foi realizado por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC). O cromatógrafo Shimadzu GC-2010 Plus com amostrador automático AOC-20i foi utilizado para esta determinação. Foram adicionados 1,0 mL de *n*-heptano às amostras (5,0 mg) e um volume de injeção de 1 µL destas foi injetado em modo de divisão de amostra de 1:20. A eluição utilizou 1 mL min⁻¹ hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C e a programação de temperatura do forno e da coluna foi matricial, iniciando-se em 120 °C permanecendo por 2 min, aquecimento a 10 °C min⁻¹ até 180 °C onde ficou por 3 min, depois a 5 °C min⁻¹ até 240 °C finalizando com um estágio isotérmico nesta temperatura por 10 min. A análise foi realizada em uma coluna Agilent CPWAX 52CB (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm). As curvas de calibração e os fatores de resposta do detector de ionização de chama foram determinados a partir de padrões cromatográficos dos ésteres e a quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando nonadecanoato de metila como padrão interno (faixa de concentração de 2,04-0,127 mg mL⁻¹), de acordo com a EN 14103:2011.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da matéria graxa

Alguns parâmetros físicos e químicos do óleo de soja refinado e do ORF foram determinados e estes se encontram apresentados na TABELA 7.

TABELA 7. ANÁLISE DE PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF) E DO ÓLEO DE SOJA REFINADO (OS).

Propriedades	Norma	ORF	OS
Teor de acidez (% ácido oleico)	Ca 5a-40	0,5 ± 0,1	0,23 ± 0,01
Índice de saponificação (mg KOH g ⁻¹ amostra)	Cd 3-25	180,8 ± 0,9	182,7 ± 4,41
Teor de água (% m m ⁻¹)	Ca 2e-84	0,129 ± 0,003	0,083 ± 0,001
Massa molar média (g mol ⁻¹)	Cd 3-25	898,4	923,1
Índice de iodo (cg I ₂ g ⁻¹ de amostra)	Cd 1-23	121,3 ± 2,6	120 -143*
Índice de peróxido (miliequivalentes de peróxido Kg ⁻¹ de amostra)	Cd 8b-90	66,5 ± 1,8	3,3 ± 1,8

*Valor de referência segundo KNOTHE (2002).

Após a caracterização conforme as metodologias da TABELA 7, pode-se observar que o ORF apresentou acréscimo em alguns dos parâmetros medidos, em relação ao OS que foi utilizado como referência. Estas diferenças, além de estarem relacionadas aos tratamentos térmicos aos quais o ORF foi exposto, também podem ser atribuídas à heterogeneidade dos óleos de fritura, já que estes podem conter percentuais variados de gordura vegetal hidrogenada e de outros constituintes oriundos de sua modificação térmica e/ou química (MARTINS *et al.*, 2013).

O acréscimo no teor de acidez no ORF (0,5% ± 0,1) em relação ao OS (0,23 ± 0,01) está diretamente relacionado à presença de água no óleo, parâmetro também determinado para o ORF (0,129% ± 0,003) e OS (0,083 ± 0,001). Durante a cocção de alimentos, compostos solúveis e água são transferidos destes materiais para o óleo usado na transferência de calor. Assim, a presença de água no material graxo repercute em reações de hidrólise dos triacilglicerídeos presentes neste, aumentando seu índice de acidez (BERRIOS *et*

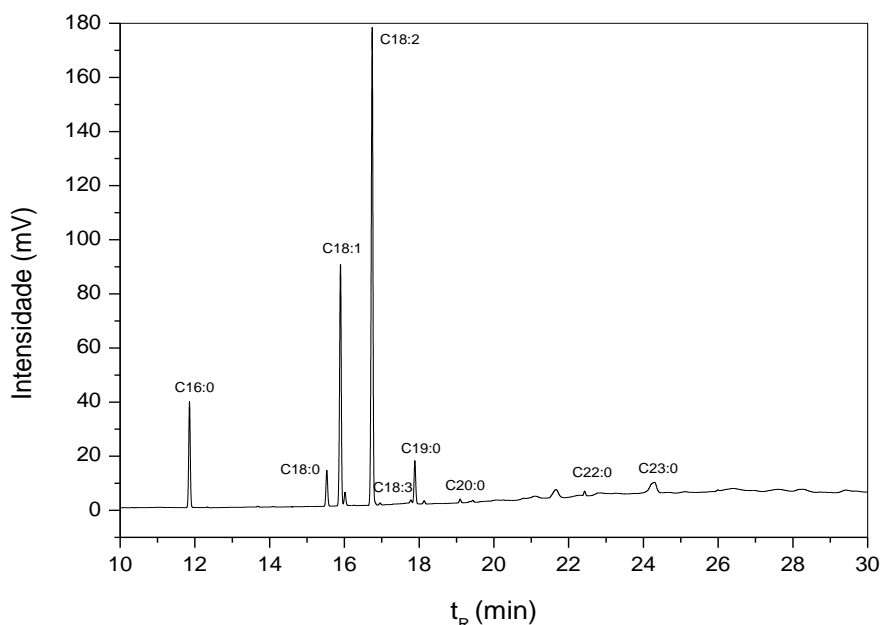
al., 2010; MARTINS, MELLO e SUAREZ, 2013).

O índice de saponificação mede a quantidade de amostra em mg de KOH que é passível de saponificação. Este parâmetro não diferiu grandemente entre o ORF ($180,8 \pm 0,9$) e o OS ($182,7 \pm 4,41$). Conforme relatado por ENCINAR *et al.* (2005), o índice de saponificação (I.S.) está diretamente relacionado à massa molar média do óleo (MM). A relação constatada entre esses dois parâmetros é que quando o I.S. aumenta a MM do óleo decresce. Estes autores determinaram o índice de saponificação e a massa molar média do ORF para posterior emprego na produção de biodiesel e observaram valores MM de $873,4 \text{ g mol}^{-1}$. A partir disso, calculou-se o parâmetro de massa molar média do ORF ($898,4 \text{ g mol}^{-1}$), obtido a partir do índice de saponificação, cujo valor apresentou decréscimo em relação ao óleo refinado ($923,1 \text{ g mol}^{-1}$). A justificativa desta diferença pode ser parcialmente atribuída ao maior teor de ácidos graxos livres do ORF, o que acarreta em uma maior quantidade de material saponificado por massa de amostra como também em um decréscimo de sua MM média (MORETTO e FETT, 1998).

A propriedade do ORF que apresentou maior distinção em relação ao OS foi o índice de peróxido (I.P.), medida que representa a quantidade em 1 kg de amostra que oxida o KI nas condições do teste (MA e HANNA, 1999). Esta diferença está provavelmente associada aos tratamentos térmicos e/ou oxidativos ao qual a matéria graxa foi exposta (FIGURA 1, pg 33). Estes processos, envolvendo o oxigênio do ar no seu estado singlete, promovem a formação de um radical livre bis-alílico a partir da retirada de um dos hidrogênios de ligações duplas dos ácidos graxos (linoleico e linolênico) que constituem os triacilglicerídeos presentes no óleo. Posteriormente, há a formação de hidroperóxidos que são instáveis e podem se decompor homoliticamente pela clivagem da ligação O-O (FIGURA 1, rota A) ou pela oxidação induzida (FIGURA 1, rota B), que resulta na formação de compostos de massa molar inferior. Assim, diversos componentes podem ser formados a partir desta decomposição como peróxidos, cetonas, aldeídos, éteres, álcoois e hidrocarbonetos (MARTINS, MELLO e SUAREZ, 2013). Quanto aos efeitos negativos que este parâmetro traz ao biodiesel, pode-se evidenciar que elevados valores de I.P. ocasionam problemas na posterior estocagem do biocombustível porque estes produtos de oxidação levam à formação de borras que aumentam a viscosidade do

biocombustível (BOUAID *et al.*, 2007).

Outro parâmetro que apresentou uma pequena variação, embora não muito significativa, foi o índice de iodo, que mede o grau de insaturação de óleos vegetais a partir da quantidade em centigramas de iodo que são absorvidas por g de amostra. Assim, encontrou-se para o ORF valores próximos ao limite inferior da faixa de I.P. estimada para o óleo de soja refinado (120-143), demonstrando que algumas ligações duplas presentes no ORF foram modificadas durante o processo de cozimento para formar outros produtos. Esta determinação é importante porque elevados índices de iodo podem repercutir em problemas na utilização do produto final, como uma menor estabilidade oxidativa e a eventual deposição de borras nas partes internas do motor. Em contrapartida, a utilização de matérias-primas com percentual elevado de ácidos graxos saturados afeta outros parâmetros do combustível como as propriedades de fluxo a frio. Contudo, o método de iodo não identifica a natureza de tais ligações duplas em relação à estrutura dos componentes do óleo (KNOTHE, 2002). Assim, realizou-se uma análise da composição química percentual em ácidos graxos do ORF (FIGURA 11), onde observou-se uma pequena variação em sua composição química em comparação ao OS (TABELA 8).



Ésteres metílicos de: C16:0 (Palmitato); C18:0 (Estearato); C18:1 (Oleato); C18:2 (Linoleato); C18:3 (Linolenato); C19:0 (Nonadecanoato); C20:0 (Aracquidonato); C22:0 (Behenato); C23:0 (Tricosenoato).

FIGURA 11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÉSTERES METÍLICOS DA MATÉRIA GRAXA RESIDUAL.

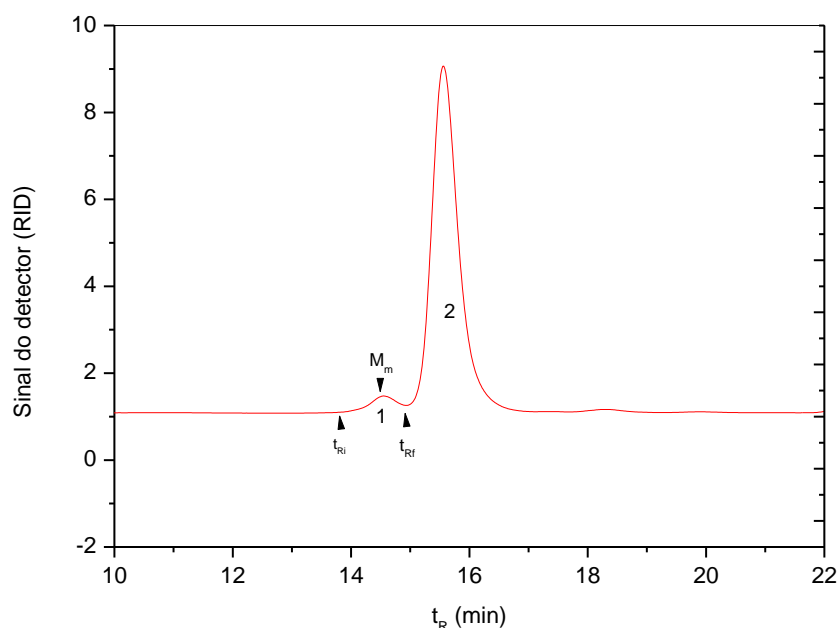
TABELA 8. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF) E DO ÓLEO DE SOJA REFINADO (OS).

Ésteres metílicos	t_R^a	Cn:m ^b	ORF ^c	OS ^d
¹ Palmitato	11,83	C16:0	11,11 ±0,06	10,55 ±0,02
² Estearato	15,51	C18:0	3,81 ±0,01	4,80 ±0,01
³ Oleato	15,87	C18:1	25,23 ±0,08	28,56 ±0,04
⁴ Linoleato	16,70	C18:2 <i>cis</i>	49,37 ±0,2	45,86 ±0,03
	16,77	C18:2 <i>trans</i>	0,21 ± 0,01	0,88
⁵ Linolenato	17,87	C18:3	0,35 ±0,01	3,33 ±0,01
⁷ Aracquidonato	19,40	C20:0	0,20 ±0,01	0,22
⁸ Behenato	22,42	C22:0	0,47 ±0,01	0,54
⁹ Tricosenoato	24,05	C23:0	0,51	0,21

^a Tempo de retenção em minutos;^b Número de carbonos na cadeia alquílica dos ácidos graxos: duplas ligações;^c Percentual mássico dos ésteres do ORF;^d Percentual mássico de ésteres do óleo de soja refinado.

A partir desta análise, pode-se observar que os materiais graxos apresentam os mesmos ácidos graxos constituintes, sendo estes os ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolênico, palmítico, araquidônico e behênico. Todavia, a composição percentual destes óleos diferiu em alguns casos. As principais diferenças residem no menor percentual de C18:3 (linolenato de metila) e maior quantidade de C18:2 (linoleato de metila). Porém, essas diferenças podem provir da heterogeneidade de óleos que compõem o ORF, ou do processo térmico ao qual este foi exposto.

Além disso, outros fenômenos podem modificar a qualidade de óleos expostos aos processos de fritura como, por exemplo, a formação de compostos a partir do desencadeamento de reações térmicas e oxidativas. Portanto, é necessário caracterizar componentes que podem ser formados a partir destas reações (RUIZ-MÉNDEZ *et al.*, 2008) e, para tanto, a técnica de cromatografia de permeação em gel (CPG) foi utilizada como indicativo da qualidade do ORF (FIGURA 12) (WOLFF, MORDRET e DIEFFENBACHER, 1991; GELLESTERDT, 1992).



¹ Compostos degradados do óleo ($t_R = 13,76$ min); ² Triacilglicerídeos do ORF ($t_R = 14,48$ min)

FIGURA 12. CROMATOGRAMA DE PERMEAÇÃO EM GEL DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA (ORF).

A presença de um analito desconhecido na amostra do ORF pode ser observada na FIGURA 12. Então, uma curva de calibração foi construída, conforme a metodologia descrita por OMONOV *et al.* (2010), para estimar a massa molar média do componente desconhecido. Assim, a massa molar média (M_m) do pico 1 (FIGURA 12) foi correspondente a 1020 g mol^{-1} , que pode ser atribuída a compostos de degradação do óleo. Além disso, as regiões demarcadas na FIGURA 12 como t_{Ri} e t_{Rf} foram avaliadas quanto a suas massas molares, sendo que em t_{Ri} encontram-se compostos na faixa de $1863,8 \text{ g mol}^{-1}$ e em t_{Rf} os compostos com massas molares próximas aos triacilglicerídeos (885 g mol^{-1}).

Definida a análise por GPC, as faixas indicadas de massas molares foram monitoradas por infusão direta em um espectrômetro de massas nas faixas de razão m/z de 870-970 (t_{Rf}) e 1700-2000 (t_{Ri}) Daltons. As Figuras 13A e 13B, indicaram respectivamente a presença de produtos de degradação que foram formados durante o processo de fritura. Assim, constatou-se que a primeira região corresponde à presença de hidroperóxidos e a t_{Ri} corresponde provavelmente a dímeros de triacilglicerídeos (WOLFF, MODRETT e DIEFFENBACHER, 1991). A

quantificação percentual destes componentes foi de 5,4% de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1.2. Este percentual é elevado e, quando presente no produto final, pode acarretar em deposições no motor de combustão; portanto, etapas de purificação podem ser requeridas para viabilizar o uso industrial desta matéria-prima (MITTELBAACH, 2001).

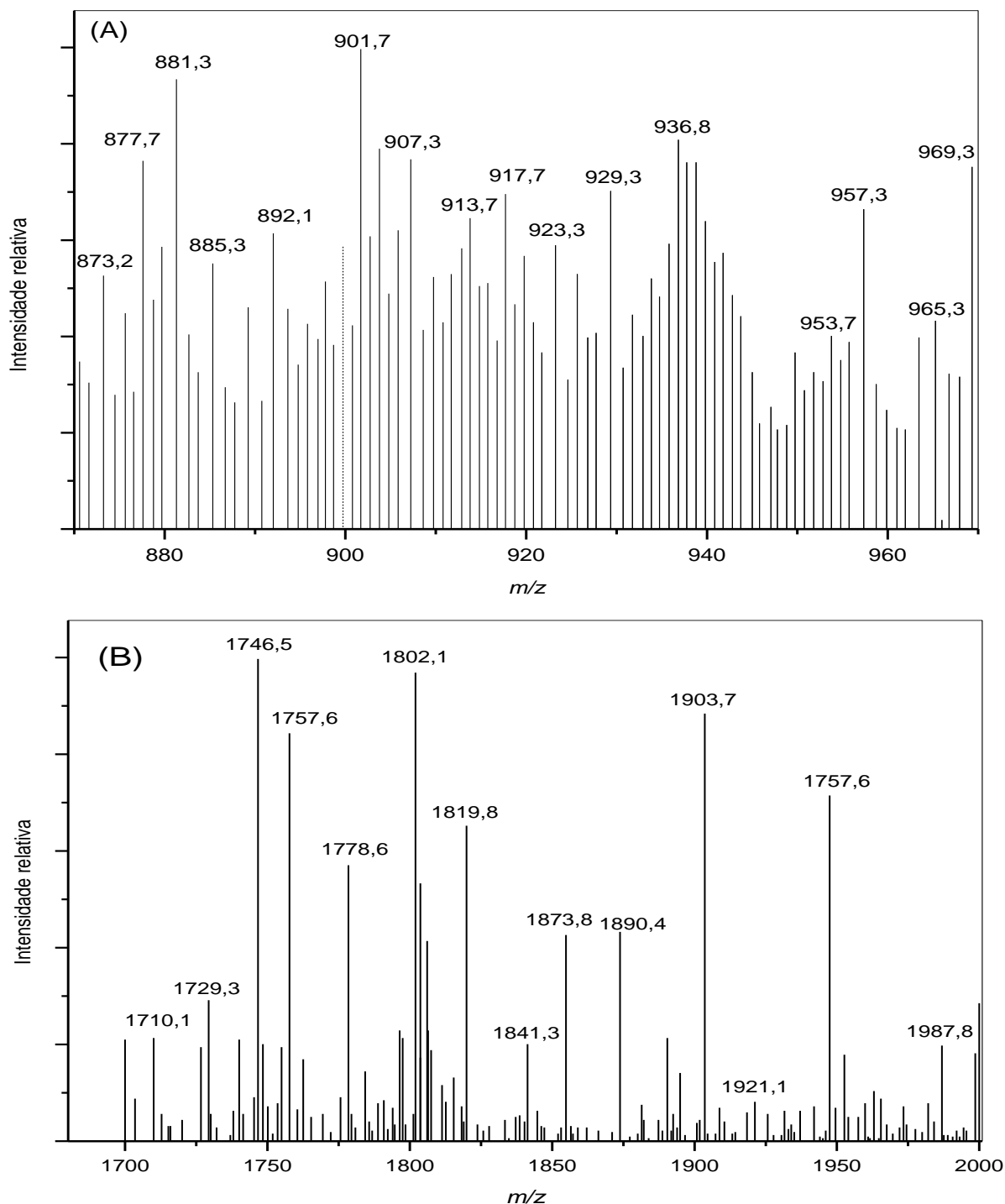


FIGURA 13. ESPECTROS DE MASSAS DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NAS REGIÕES m/z DE (A) 870-970 E (B) 1700-2000, QUE CORRESPONDEM A FAIXAS DE DETECÇÃO DE COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO.

Um exemplo do elevado grau de complexidade dos componentes que podem estar presentes no ORF e que dificultam a total elucidação destes contaminantes pode ser observado na FIGURA 14. Porém, a possibilidade da presença de outros compostos como peróxidos, cetonas, aldeídos, éteres e outras moléculas de alta massa molar não é descartada. Isto porque é sabido que uma miscelânea de produtos de degradação pode ser gerada nas reações térmicas e oxidativas decorrentes do processo de fritura e posteriormente a este devido à presença de espécies de alta reatividade no óleo, como os hidroperóxidos. Estas espécies podem desencadear diversas reações radiculares que resultam na formação de muitas estruturas que, posteriormente, ainda podem se combinar gerando outros subprodutos (FIGGE, 1971).

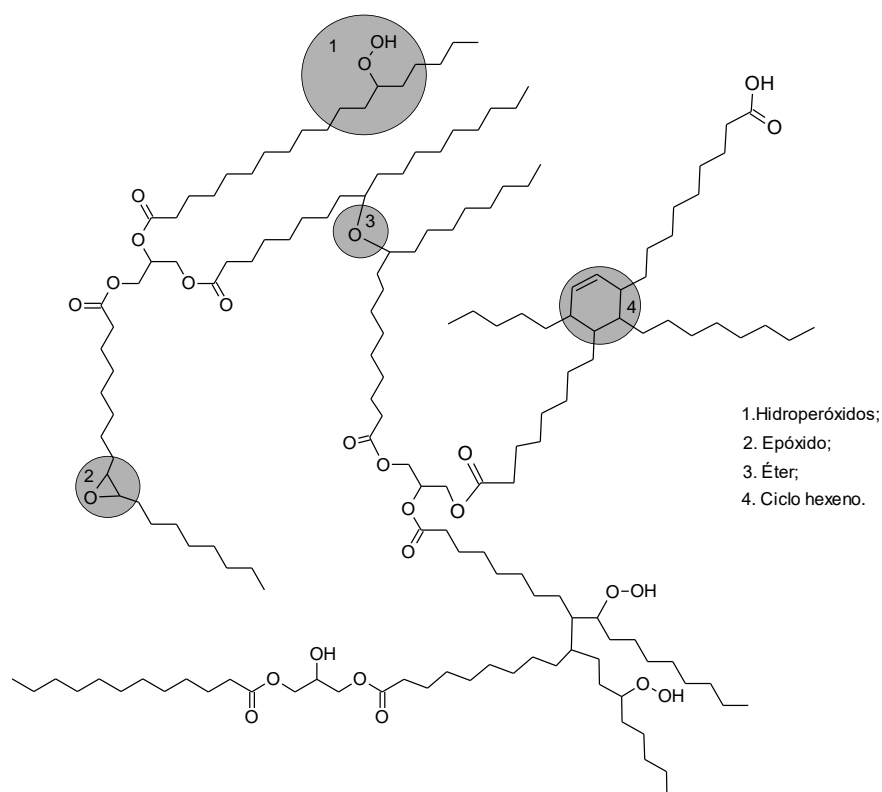


FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUE PODEM SER FORMADAS A PARTIR DE REAÇÕES TÉRMICAS E OXIDATIVAS ENVOLVENDO TRIACILGLICERÍDEOS E SEUS DERIVADOS.

FONTE: O AUTOR (2015).

SUPPLE *et al.* (2002) realizaram ensaios de purificação de um óleo residual de fritura a partir da injeção de vapor seguida de filtração em peneiras de

diferentes diâmetros (5 até 1 mm). Os ensaios físicos e químicos foram realizados para avaliar a remoção dos contaminantes do óleo. Os autores observaram decréscimos em propriedades como a densidade e a viscosidade cinemática, associando-os com a remoção de compostos de alta massa molar provenientes da degradação do óleo, como oligômeros e polímeros. Ademais, os índices de peróxido e de acidez também decaíram, demonstrando que este processo é eficaz na remoção destes contaminantes dos óleos residuais.

3.2. Determinação das atividades de hidrólise e esterificação da N435

A presença de água em excesso pode favorecer as reações de hidrólise de ésteres e assim diminuir o rendimento da reação. A água também pode adsorver sobre a resina na qual a enzima está imobilizada, restringindo o acesso das moléculas de óleo ao sítio onde a catálise efetivamente acontece (TALUKDER *et al.*, 2009). Desta forma, a análise da capacidade hidrolítica da lipase N435 foi determinada a fim de avaliar se a água presente na matéria prima residual de fritura poderia comprometer a sua atividade na conversão de triacilglicerídeos em ésteres etílicos.

A atividade hidrolítica em pHStat da lipase imobilizada foi de apenas 0,32 U g⁻¹. Todavia, quando esta atividade foi avaliada em meio orgânico, valores de 63,3 ± 3,4 U g⁻¹ foram obtidos, contrariando evidências preliminares de que esta enzima não promove a hidrólise de triacilglicerídeos em meio orgânico (CABRERA *et al.*, 2009).

MEI *et al.* (2003), em seu trabalho de elucidação estrutural da lipase N435, demonstraram através de imagens de espectroscopia no infravermelho que, no estado imobilizado, a distribuição da lipase de *Ca/B* no suporte Lewatit é uniforme e localizada em um filme externo de 80-100 µm que recobre as partículas do suporte. Ademais, estes autores sugeriram que a lipase apresenta uma forte afinidade pelo suporte e que o compósito pode favorecer um fortalecimento das interações enzima-enzima. Além disso, foi demonstrado que o volume do poro do suporte é 10 vezes superior ao tamanho da enzima, o que não acarretaria problemas difusionais em seu interior. Estes fatores, associados, justificam a elevada atividade e eficiência de reuso deste biocatalisador.

Por outro lado, a atividade de esterificação em meio orgânico da lipase imobilizada (206,3 U g⁻¹) é bastante elevada quando comparada com outras

lipases como a produzida por Soares *et al.* (2013) que obtiveram, em condições similares, uma atividade da lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada naturalmente em um sólido fermentado de $5,8 \pm 0,3 \text{ U g}^{-1}$ do biocatalisador.

3.3. Ensaio preliminares de transesterificação do óleo residual de fritura

Tendo em vista o ajuste nas condições da etanolise do ORF, alguns ensaios preliminares foram realizados para investigar o efeito das variáveis que podem influenciar na produção de ésteres alquílicos via catálise enzimática. Por este motivo, alguns parâmetros foram inicialmente avaliados de forma univariada, como a razão molar álcool:óleo, a carga enzimática, o uso de cossolvente e a quantidade de água presente no meio de reação.

3.3.1. Efeito da adição de cossolvente

Como sabido, lipases são inibidas pelos álcoois normalmente utilizados na síntese de biodiesel. Deste modo, uma prática comum é o emprego de cossolventes hidrofóbicos para minimizar este inconveniente e auxiliar na diminuição dos problemas de transferência de massa (SOTOFT *et al.*, 2010). Assim, *n*-hexano foi adicionado às reações de etanolise e o resultado foi comparado a uma reação realizada sem adição deste solvente (FIGURA 15). A motivação para a escolha do *n*-hexano como cossolvente foi por este já ter demonstrado a sua capacidade de aumentar as taxas de conversão e evitar a desativação da enzima pelo álcool utilizado na reação (CHEN *et al.*, 2009; FJERBAEK, CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009; BAJAJ *et al.*, 2010).

As condições empregadas neste estudo, avaliadas anteriormente por Chen *et al.* (2009), envolveram razão molar metanol:óleo de 3:1, 5% de biocatalisador (m m^{-1}) e 10% de *n*-hexano em relação à massa do óleo (quantidade de solvente suficiente para diminuir problemas de transferência de massa dos reagentes e reduzir o efeito de toxicidade causado à lipase) a 40 °C e 150 rpm.

O processo de conversão de triacilglicerídeos a ésteres etílicos e o conteúdo dos intermediários reacionais diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos produzidos durante as reações realizadas na presença e ausência de *n*-hexano foram monitorados durante 24 h. As FIGURAS 15A e 15B demonstram que a adição de cossolvente aparentemente não exerceu uma modificação significativa

na velocidade inicial, bem como no equilíbrio da reação, a qual atingiu um teor em EEAG de 91,9% após 24 h de reação na ausência de *n*-hexano, enquanto que 95,4% de teor de EEAG foi obtido na presença de 10% de *n*-hexano.

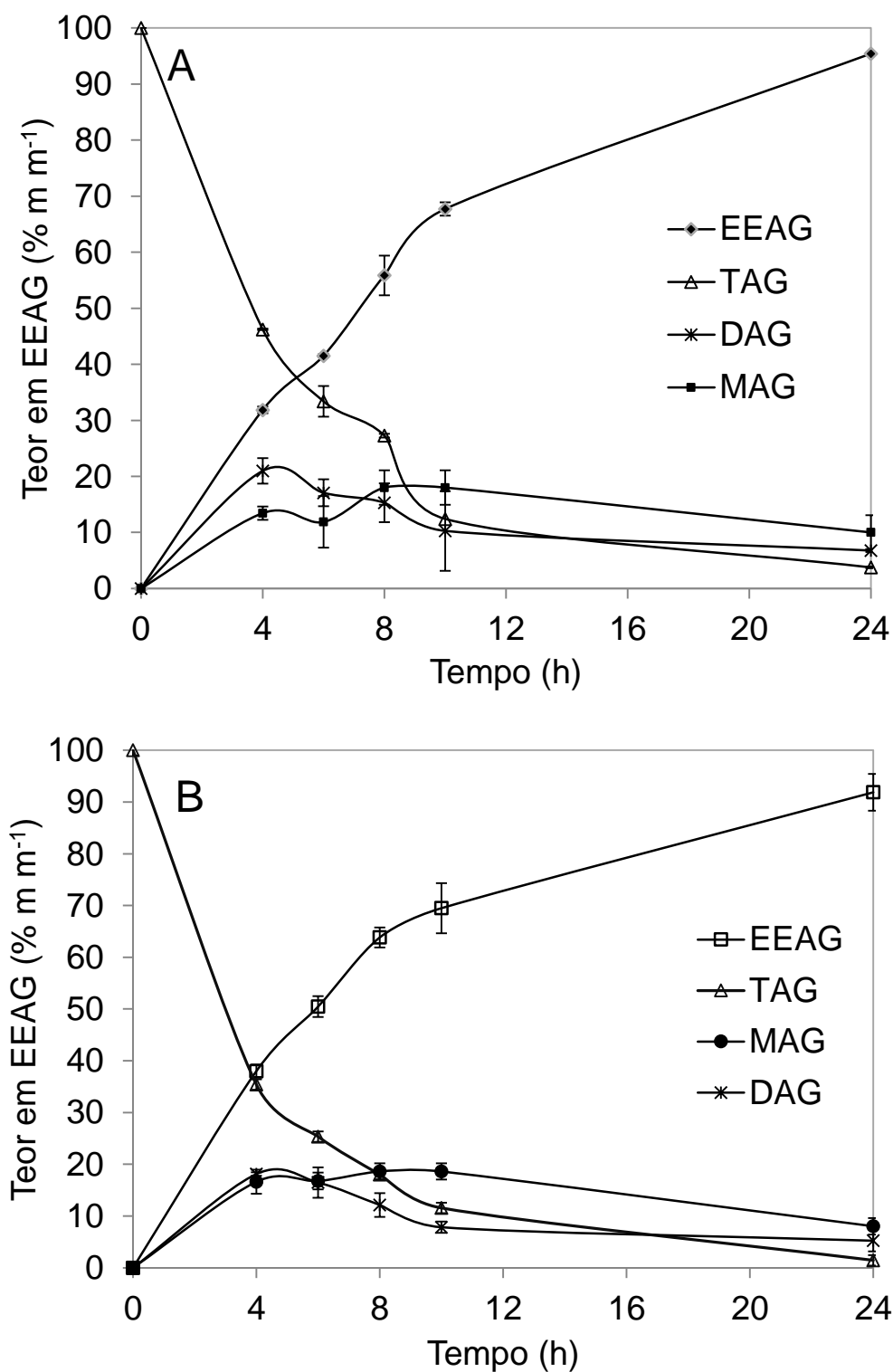


FIGURA 15. ESTUDO DO EFEITO (A) DA AUSÊNCIA E (B) DA PRESENÇA DE 10% DE *n*-HEXANO NO MEIO DE REAÇÃO SOB O TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS A PARTIR DA ETANÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

O teste estatístico de Tukey, em um intervalo de confiança de 95%, foi aplicado para a comparação entre cada um dos dados experimentais da reação. Os resultados desta análise indicaram que os valores de monoacilglicerídeos e de diacilglicerídeos das reações conduzidas na presença e na ausência de *n*-hexano não diferiram estatisticamente ao longo de todo o tempo da reação. Além disso, o teste de Tukey (dados não mostrados) para a comparação entre a reação na presença e na ausência de *n*-hexano demonstrou que há diferença estatisticamente significativa entre os resultados de consumo de acilglicerídeos e de produção de ésteres etílicos nos tempos iniciais da reação (2 a 8 h). Isto demonstra que as taxas reacionais iniciais de produção de EEAG são maiores para a reação na ausência de *n*-hexano, sendo que isto não foi observado em outros tempos de reação. Esta diferença pode ter sido decorrente de erros experimentais ou de problemas de transferência de massa devido à formação de um sistema bifásico.

OLIVEIRA e OLIVEIRA (2001) realizaram a etanólise do óleo de palma em um sistema que continha *n*-hexano como cossolvente. A partir de um delineamento experimental, estes autores conseguiram 58,3% de EEAG empregando razão molar etanol:óleo 10:1, 20% de enzima (m m^{-1}) em relação ao óleo, sem adição de água, 40 °C, 200 rpm, 6 h.

RAITA *et al.* (2010) estudaram a conversão do óleo de palma em ésteres etílicos catalisada pela N435 em um sistema com *terc*-butanol como cossolvente. Nas condições do ensaio envolveram razão molar etanol:óleo de 4:1, 20% de enzima em relação ao óleo (m m^{-1}), razão molar de *terc*-butanol:óleo 1:1, 45 °C, 150 rpm e 24 h de reação, foram obtidos rendimentos de 87,2% em EEAG.

Estes trabalhos, quando comparados aos resultados deste estudo, demonstram que não há a necessidade de adição de cossolvente para o alcance de elevadas conversões nas reações de etanólise catalisadas pela N435 em ambientes aquorrestritos. Tal informação é de particular importância porque o emprego de cossolvente pode tornar o processo oneroso, devido à necessidade de sua recuperação e reuso (DOSSAT *et al.*, 2002; SHIMADA, *et al.*, 2002; SHAH e GUPTA, 2007). Além disso, de acordo com FJERBAEK, CHRISTENSEN e NORDDAHL (2009) e SALUM (2010), sistemas livres de cossolvente são o objetivo futuro dos processos enzimáticos, principalmente porque a volatilidade, inflamabilidade e toxicidade de alguns solventes orgânicos aumenta a

periculosidade e dificulta a posterior evolução do processo à escala industrial. Deste modo, todos os demais ensaios foram realizados em sistema livre de cossolvente.

3.3.2. Efeito da razão molar

A proporção molar entre o álcool e o óleo é uma variável que apresenta efeitos consideráveis na síntese de biodiesel. O excesso de álcool acima da razão estequiométrica de 3:1 é comumente utilizado para assegurar uma velocidade de reação elevada e minimizar limitações difusionais (RIBEIRO *et al.*, 2011). No entanto, elevados níveis de álcool, principalmente os de cadeia alquílica curta (<3 átomos de carbono), podem resultar na inativação da enzima. Isto ocorre principalmente por inibição competitiva, onde as moléculas do solvente se ligam ao seu sítio catalítico (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004), ou pela retirada da água essencial em torno da enzima, provocando uma mudança na sua conformação nativa e causando perda de sua atividade catalítica por desnaturação (SHIMADA *et al.*, 2002).

CERVERÓ, ALVAREZ e LUQUE (2014) estudaram o efeito das razões molares etanol:óleo de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 6:1 e 8:1 na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase N435. Estes autores relataram decréscimos nos teores de ésteres com o uso de RM maiores que 4:1. Todavia, estas conclusões ficam incertas devido à ausência de replicatas reacionais e de testes estatísticos. Portanto, o efeito da razão molar etanol:óleo na conversão em ésteres foi avaliado em diferentes níveis (3:1, 4:1, 6:1 e 9:1), como apresentado na FIGURA 16.

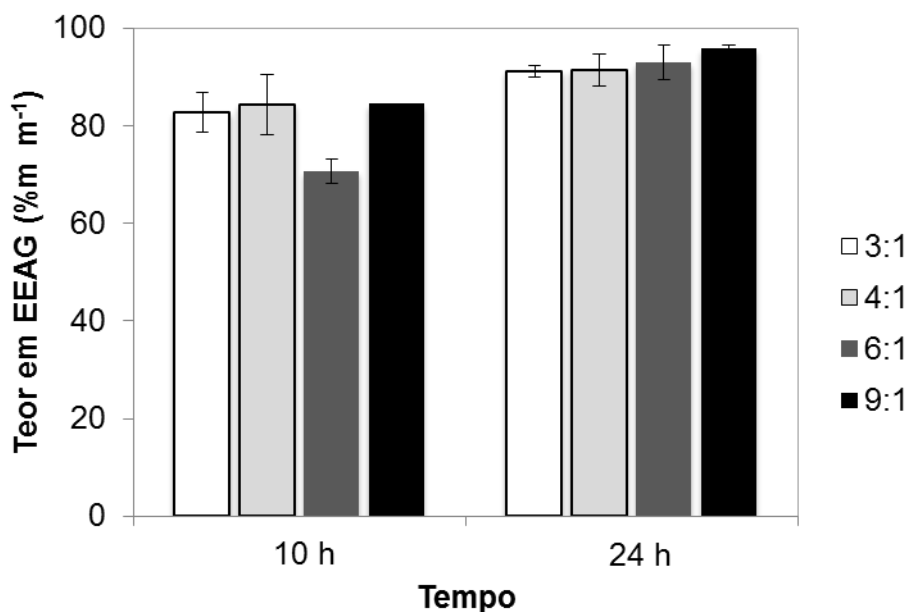


FIGURA 16. ESTUDO DO EFEITO DA RAZÃO MOLAR ETANOL:ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA NA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

O teste estatístico de Tukey em um intervalo de confiança de 95% foi empregado para avaliação dos dados obtidos em diferentes razões molares (FIGURA 16). Dessa forma, notou-se que em 10 h de reação, apenas a RM etanol:óleo de 6:1 se diferenciou estatisticamente dos demais resultados. Já para 24 h, resultados distintos foram obtidos com a razão molar de 3:1, sendo esta a que resultou no menor valor de conversão.

Com o aumento da razão molar para 9:1, portanto, acima do valor estequiométrico de 3:1, a conversão obtida em 24 h de reação foi aumentada em 7 p.p. Tal resultado era esperado porque maiores concentrações de álcool no meio deslocariam o equilíbrio da reação no sentido da formação do produto de interesse e, neste caso, foi necessário um maior tempo de reação para se observar este efeito na velocidade de conversão realizada pela enzima. Estes resultados corroboram com dados já obtidos por RIBEIRO *et al.* (2012), que também demonstraram que o aumento na razão molar EtOH:óleo repercute em aumento nas conversões de etanolise catalisada pela N435, sem inibi-la pelo excesso de álcool no meio de reação. Além disso, a presença de maiores quantidades de álcool pode minimizar a limitação difusional e manter o glicerol em solução. Isto evitaria o impedimento do acesso do substrato à enzima causado pela adsorção de glicerol e a subsequente formação de uma camada hidrofílica

sobre a superfície moderadamente polar de seu suporte. Tal fato confirma o que foi relatado por PIYATHEERAWONG *et al.* (2004), de que a lipase N435 catalisa eficientemente as reações de etanolise sob concentrações elevadas de etanol sem um decréscimo expressivo de sua atividade catalítica.

3.3.3. Efeito da quantidade de enzima

A quantidade de catalisador deve ser controlada a fim de proporcionar um contato efetivo do substrato com o sítio ativo sem o uso excessivo de enzima no meio de reação, o que aumenta o custo de produção (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008). Assim sendo, a FIGURA 17 demonstra o efeito da concentração do biocatalisador sobre o teor de ésteres do produto final. A razão molar para este experimento foi selecionada a partir do experimento realizado anteriormente para avaliar este parâmetro anteriormente (vide 5.3.2.). As condições reacionais empregaram razão molar etanol:óleo de 4:1, 40 °C e agitação de 150 rpm por 10 e 24 h.

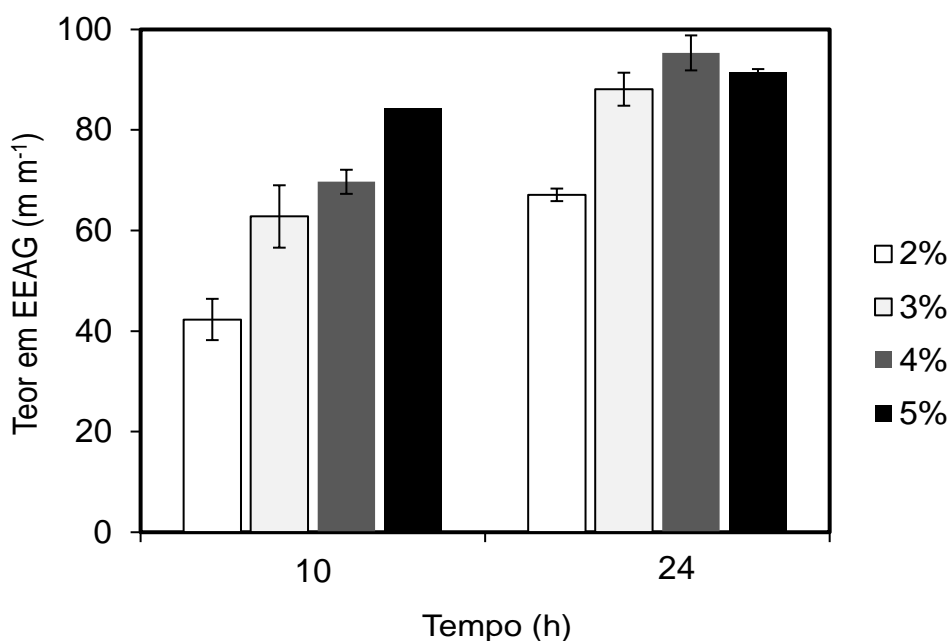


FIGURA 17. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CATALISADOR NO TEOR DE ÉSTERES ETÍlicos NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

De acordo com a FIGURA 17, observou-se que em 10 h de reação o aumento da proporção de biocatalisador influenciou positivamente na produção de ésteres etílicos, enquanto que para tempos reacionais de 24 h, este efeito foi observado apenas com o aumento da concentração de catalisador de 2% para

3%, enquanto que acima de 3% este efeito não foi pronunciado, mantendo-se conversões superiores a 95%. Em tempos menores de reação (10 h), um acréscimo de conversão de aproximadamente 25% foi alcançado quando a proporção de biocatalisador foi aumentado de 2% para 5%. Este fato pode evidenciar que a quantidade de catalisador altera a velocidade inicial da reação e isto permite a obtenção de conversões elevadas em menores tempos reacionais, como consequência do maior contato entre substrato e sítio catalítico da lipase. De acordo com VELJKOVIĆ, AVRAMOVIĆ e STAMENKOVIĆ (2012), lipases têm menor atividade catalítica em etanólise quando comparadas à metanólise, exigindo assim elevadas cargas enzimáticas (5 a 30%). Todavia, as cargas enzimáticas utilizadas neste trabalho foram baixas quando em comparação aos resultados obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2004), que otimizaram a conversão do óleo de mamona a monoésteres etílicos utilizando a lipase N435 em um sistema contendo 40 mL de *n*-hexano como cossolvente. Estes autores obtiveram o máximo de conversão de 81,4% em 8 h com 20% m m⁻¹ de enzima, sem adição de água e com razão molar etanol:óleo de 10:1 a 65 °C e 200 rpm.

O teste de Tukey demonstrou, em um intervalo de confiança de 95%, que os resultados obtidos em 10 h de reação para as cargas enzimáticas de 3% e 4% não diferiram estatisticamente, bem como entre as proporções de 4% e 5% de enzima.

3.3.4. Efeito do teor de água

A água é conhecida por influenciar tanto na atividade quanto na estabilidade de lipases. Assim, meios de reação com baixo conteúdo de água (aquorestritos) são desejáveis porque este parâmetro é indispensável para manter a estrutura terciária da enzima cataliticamente ativa (MANJÓN, IBORRA e AROCAS, 1991; FORESTI, ERRAZU e FERREIRA, 2005). Ademais, a atividade da lipase depende de seu estado de hidratação, que permite o aumento da sua flexibilidade e, portanto, é necessário controlar a quantidade de água presente no meio de reação. Em contrapartida, elevados teores de água no meio de reação podem favorecer a ocorrência de reações secundárias, como no caso da hidrólise dos ésteres graxos (NOUREDDINI *et al.*, 2005).

FERREIRA, SOUZA e CAETANO (2008) ao utilizar etanol 96% (v v⁻¹) na produção de EEAG catalisada pela lipase Lipozyme TL IM, obtiveram elevados

rendimentos de 90% nas condições de 2,33% de enzima, razão molar etanol:óleo de 3:1, 35-38 °C e 24 h de reação.

A otimização do conteúdo de água presente no meio de reação é de particular interesse quando se utilizam óleos de baixa qualidade, que geralmente apresentam teor de água relativamente alto. Sendo assim, o efeito do teor de água na obtenção dos produtos de interesse foi avaliado através da adição de percentuais de água (m m^{-1}) em relação ao substrato (FIGURA 18). As condições reacionais empregadas foram: razão molar etanol anidro:óleo de 4:1, 3% do biocatalisador em relação ao substrato, 40 °C e agitação de 150 rpm. Ainda, vale ressaltar que os teores de água foram calculados adicionando-se a contribuição da água presente no etanol utilizado nestes ensaios e, por isso, o percentual de 0,2% corresponde à água presente no etanol anidro utilizado como substrato.

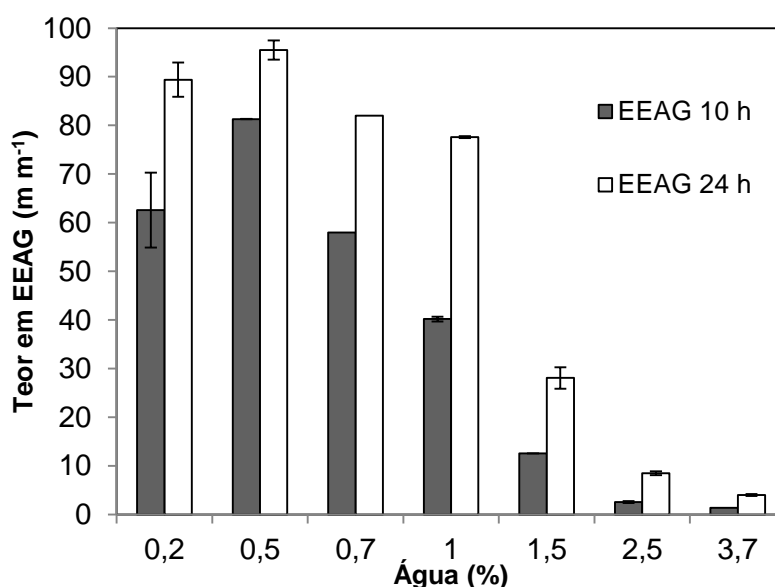


FIGURA 18. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA SOBRE O TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

O estudo do efeito da água na conversão em ésteres etílicos confirmou que a lipase demanda certa quantidade de água para catalisar eficientemente a reação. A FIGURA 18 indica que o teor de água de 0,5% já presente no ORF é ideal e que adições subsequentes de água ao meio proporcionaram um decréscimo na conversão em ésteres. Ainda, a utilização de etanol hidratado, que corresponde ao ponto de 0,7% de água, demonstrou que nestas condições experimentais houve uma queda de 23,3 p.p. nas conversões em 10 h de reação, demonstrando a necessidade de um maior controle do teor de umidade (ou água)

da matéria-prima quando de seu uso no processo de produção.

DENG *et al.* (2005) observaram uma redução de 50% no rendimento em EEAG com o aumento da concentração inicial de água de 2,5 a 7,9% m m⁻¹ na etanolise do óleo de girassol usando a lipase N435. Portanto, a presença de teores de água acima do necessário pode favorecer as reações de hidrólise dos triacilglicerídeos, como também resultar na adsorção de moléculas de água nos poros do suporte em que a enzima foi imobilizada, impedindo o acesso de substratos hidrofóbicos aos sítios ativos e proporcionando efeitos negativos à reação (CHESTERFIELD *et al.*, 2012).

Após a realização de estudos univariados para a definição de diretrizes para o desenvolvimento do trabalho, estas informações foram utilizadas na definição dos níveis inferior e superior dos experimentos de pré-otimização multivariada da produção de EEAG (item 4.4).

3.4. Pré-otimização fatorial fracionada para trans/esterificação do óleo residual de fritura

Uma ferramenta valiosa à otimização de processos industriais é o uso de planejamentos fatoriais, visto que estes são capazes de revelar as relações entre as variáveis e a compreensão de como estas variáveis influenciam e podem melhorar a resposta do sistema (DOMINGOS *et al.*, 2008).

Materiais graxos oriundos de processos de fritura podem conter diferentes percentuais de água e AGLs devido ao tratamento térmico a que são submetidos. Neste sentido, é necessário avaliar o efeito do teor de água tolerado pelo biocatalisador e, em amostras de ORF com elevados teores de AGLs, deve-se considerar que um mol de água é formado como produto em cada etapa das reações de esterificação (CHESTERFIELD *et al.*, 2012). Portanto, um planejamento experimental que englobou estes parâmetros (teores de AGLs e água) em diferentes níveis foi realizado com a finalidade de prever os seus efeitos sobre a produção de ésteres etílicos a partir do ORF (TABELA 9).

TABELA 9. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO $3(4^{-1})$.

Exp.	Condições de reação				C _{Tot} (%)	C _E (%)	C _T (%)
	N435 ^a	Razão molar ^b	Água ^c	AGL ^d			
1	3	3:1	0,840	20	19,2	85,8	2,7
2	3	9:1	1,441	20	33,6	87,4	4,2
3 ^{pc}	3	6:1	1,502	15	29,2	86,7	3,9
4 ^{pc}	3	6:1	1,540	15	31,5	80,5	6,1
5	5	3:1	0,840	15	20,4	86,9	2,7
6	1	6:1	0,840	20	20,5	76,6	4,8
7	1	9:1	0,840	15	23,6	78,6	5,0
8	5	9:1	2,038	15	33,2	81,0	6,3
9	5	9:1	2,051	10	36,9	74,9	9,3
10	3	6:1	0,840	15	35,9	83,1	6,1
11	5	3:1	1,458	10	14,5	82,8	2,5
12	5	6:1	2,063	15	26,6	82,9	4,5
13	1	3:1	1,671	20	15,0	85,8	2,1
14	3	3:1	2,064	10	20,1	81,6	3,7
15	5	9:1	0,840	20	59,7	80,3	11,7
16	3	9:1	2,046	15	25,9	73,4	6,9
17 ^{pc}	3	6:1	1,438	15	23,1	77,6	5,2
18	3	6:1	1,448	10	25,7	68,6	8,1
19	1	6:1	2,075	10	17,3	88,7	1,9
20	1	6:1	1,426	15	11,0	82,4	1,9
21	5	3:1	2,044	20	22,8	90,1	2,3
22	1	9:1	2,063	20	18,1	87,6	2,2
23	1	3:1	2,119	15	12,7	86,1	1,8
24	3	6:1	2,037	20	23,4	90,5	2,2
25 ^{pc}	3	6:1	1,443	15	23,7	88,5	2,7
26	5	6:1	0,840	10	44,8	81,0	8,5
27	1	3:1	0,840	10	16,9	79,0	3,5
28	1	9:1	1,408	10	16,5	82,7	2,9
29	3	3:1	1,505	15	11,7	76,1	2,8
30	3	9:1	0,840	10	43,8	74,4	11,2
31	5	6:1	1,474	20	24,8	86,3	3,4

^a Percentual mássico do biocatalisador por massa de ORF;^b Razão molar de etanol:ORF;^c Quantidade de água por massa de ORF;^d Percentual mássico de ácido graxo livre adicionado por massa de ORF;p.c. Ponto central do planejamento experimental; C_{Tot}, conversão total; C_E, conversão de esterificação; C_T, conversão de transesterificação.

Para se obter uma boa estimativa de erros experimentais, repetições autênticas podem ser inconvenientes. Portanto, uma melhor estimativa destes erros pode ser obtida pela inclusão de pontos centrais em um planejamento, ou seja, o valor médio de todas as variáveis estudadas (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005). Neste trabalho, os experimentos 3, 4, 17 e 25 correspondem à quadruplicata do ponto central e os resultados obtidos indicam a boa confiabilidade dos resultados obtidos, já que estas apresentaram um desvio padrão de 5,18% em relação à esterificação (C_E), de 1,5% em relação à (C_T) de 4,13% em relação à conversão total (C_{Tot}), baseados nos dados contidos na TABELA 9.

As condições que proporcionaram maior conversão a ésteres etílicos nas após 8 h de reação, a 40 °C e 150 rpm, foram: R15 (C_{Tot} de 59,7%; C_E de 80,33%; C_T de 11,7%), R26 (C_{Tot} de 44,8%; C_E de 81,05%; C_T de 8,5%) e R30 (C_{Tot} de 43,8%; C_E de 74,41%; C_T de 11,2%) (TABELA 9). Observa-se que elevadas conversões de esterificação (80%) foram obtidas em todos os experimentos e estas revelam que a conversão relativa à transesterificação é o fator limitante ao serem realizadas reações simultâneas de transesterificação e esterificação, uma vez que sua cinética é mais lenta em comparação à de esterificação (BRUGNAGO, 2011). Após a obtenção dos dados experimentais, estes foram avaliados através da análise de variância simples (ANOVA) (TABELA 10).

TABELA 10. ANÁLISE DE VARIÂNCIA SIMPLES PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS RESULTADOS DE CONVERSÃO DA TABELA 9.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	F _{tab}
Regressão	3467,39	22	157,61	21,74	3,13
Resíduos	57,99	8	7,25		
Falta de ajuste	6,86	5	1,37	0,08	9,01
Erro puro	51,13	3	17,04		
Total	3525,37				

SQ, soma dos quadrados; GL, grau de liberdade; MQ, média dos quadrados; F, valor calculado; F_{tab}, valor de F tabelado.

O modelo quadrático avaliado em três níveis foi validado segundo os dados da TABELA 10. Este modelo só foi considerado satisfatório porque apresentou elevadas regressões lineares e uma pequena falta de ajuste em relação ao *F* de Fischer em um nível de confiança de 95%. A validade estatística

dos resultados foi confirmada pelo R^2 de 0,985, com o valor de máxima variância explicada (%VAR) de 0,983, expressando que 98,3% da variância foi explicada pelo modelo proposto que, quando confrontados com o baixo valor de F da falta de ajuste, indicam que os resíduos existentes são praticamente nulos, demonstrando que este modelo é confiável e previsível (TABELA 10). Além disso, um bom ajuste pode ser observado na FIGURA 19 a partir dos dados experimentais (pontos cartesianos) em relação aos valores preditos (reta vermelha). Visto isto, as variáveis e sua influência na resposta em teor de EEAG foram analisadas pelo gráfico de Pareto (FIGURA 20).

O diagrama de Pareto (FIGURA 20) demonstrou que a quantidade de enzima (L) foi a variável independente de efeito mais positivo, ou seja, maiores proporções de enzima aumentam a formação do produto. Além disso, a presença de etanol em excesso foi estatisticamente significativa para a produção de ésteres etílicos, sendo a razão molar (L) um parâmetro positivo para a resposta avaliada. Deste modo, embora os dados de CHESTERFIELD *et al.* (2012) indiquem o contrário, a presença de etanol não comprometeu a atividade de síntese da lipase imobilizada, fato também evidenciado no efeito secundário positivo entre a concentração de enzima (L) e a razão molar (L).

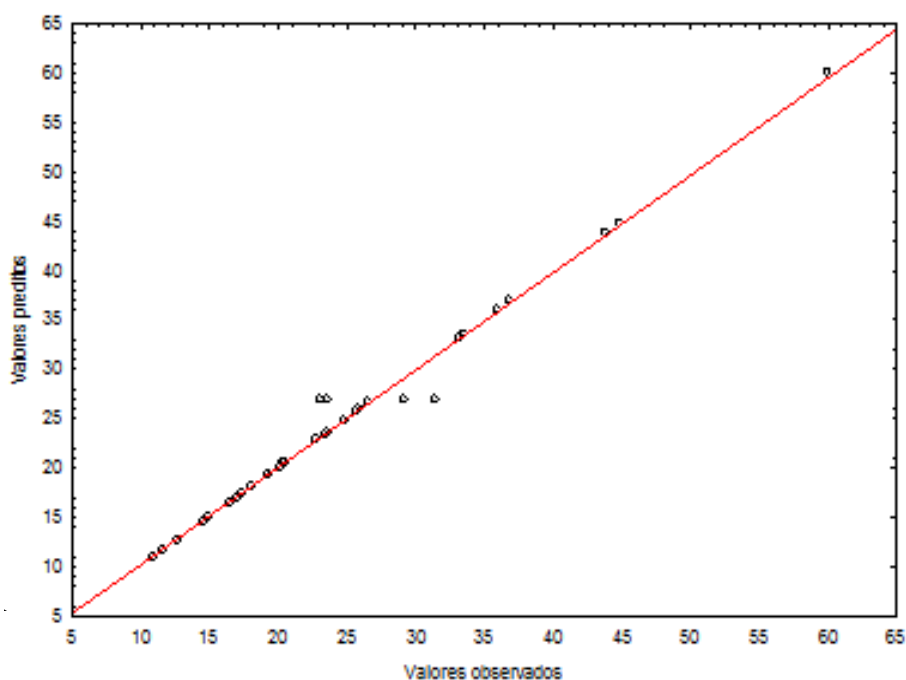


FIGURA 19. VALORES OBSERVADOS PARA A CONVERSÃO vs. VALORES PREVISTOS PARA A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍlicos.

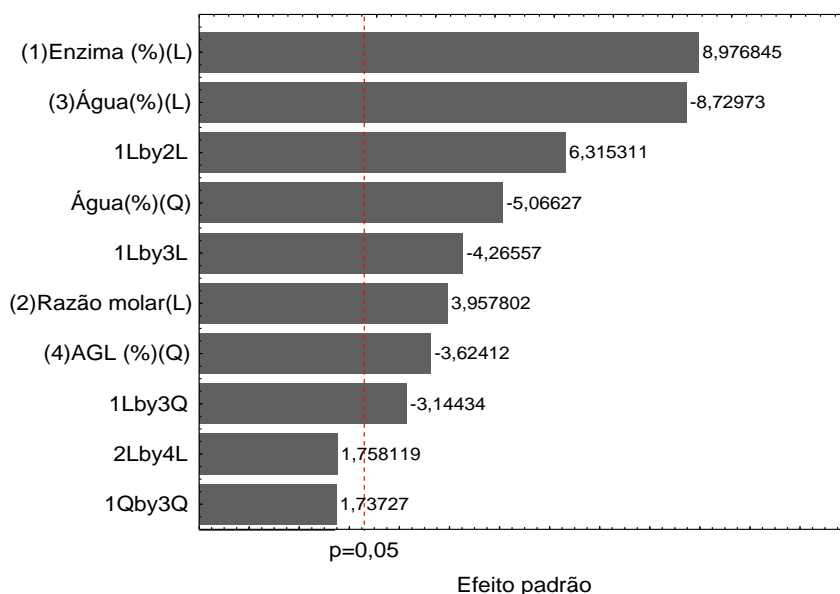


FIGURA 20. DIAGRAMA DE PARETO DA CONVERSÃO TOTAL EM ÉSTERES ETÍLICOS.

Os efeitos negativos mais significativos sobre a função resposta foram causados pelo termo quadrático do teor de água (L,Q) e pelas interações entre a quantidade de enzima e o teor de água (L). Estes efeitos levam a crer que uma parcela da água do meio de reação provavelmente permaneceu adsorvida no suporte em que a enzima se encontra imobilizada, repercutindo em problemas de acessibilidade do substrato ao sítio ativo da lipase (HAMA *et al.*, 2011). Segundo CHAMOULEAU *et al.* (2001), estudos de microscopia eletrônica de varredura confirmam que com elevados valores de atividade de água (aW), as partículas do biocatalisador são solvatadas, impedindo o acesso de substratos lipofílicos pelo agregamento das partículas da N435.

O efeito do teor de AGLs (Q) apresentou influência negativa sobre a conversão. Esta observação está provavelmente associada à formação de 1 mol de água para cada mol de EEAG gerado como produto na esterificação, o que ocasionaria em maiores teores de água no meio de reação e, como já visto, a presença de água tem efeito negativo (-8,72 p.p.) sobre a conversão. As demais variáveis e interações não apresentaram efeitos significativos para esta análise de dados ($p < 0,05$).

Com base nos resultados do modelo e no diagrama de Pareto, realizou-se a construção das superfícies de resposta envolvendo as variáveis mais significativas à obtenção de produtos com alto teor em EEAG e estas foram utilizadas na discussão das tendências observadas (FIGURAS 21 e 22).

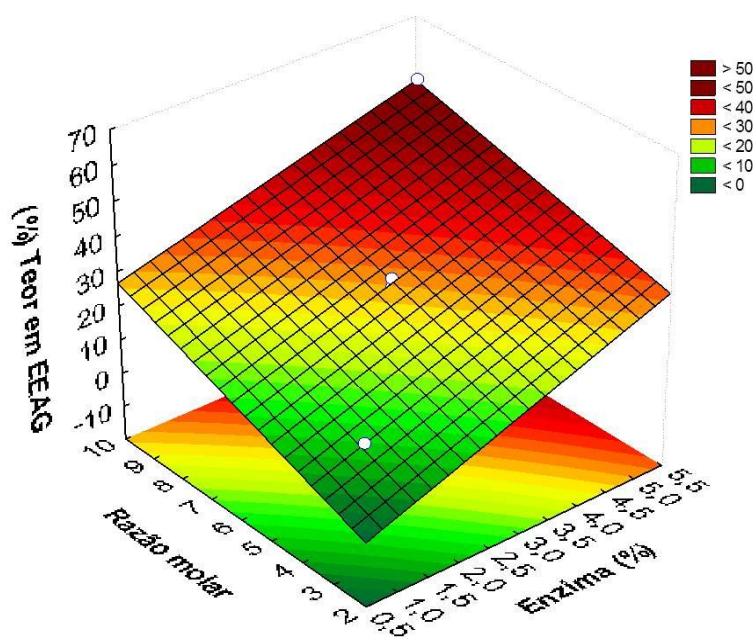


FIGURA 21. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE RAZÃO MOLAR E ENZIMA SOB A RESPOSTA EXPRESSA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.

Conforme apresentado na FIGURA 21, mantendo-se constante a água e o teor de AGLs, o teor de ésteres aumenta quando se eleva a razão molar etanol:óleo juntamente com a quantidade de enzima (+6,32 p.p., conforme o diagrama de Pareto). Já para a interação binária demonstrada na FIGURA 22, pode ser observado na superfície de resposta que a diminuição dos teores de água e o aumento na quantidade de enzima acarretam em melhores respostas em EEAG, sendo que o inverso ocasionaria em um decréscimo sob a mesma resposta (-4,26 p.p., conforme o diagrama de Pareto). Estes resultados corroboram com os dados obtidos por CHEIRSILP *et al.* (2008) para a etanólise do óleo de palma em um sistema livre de cossolvente, utilizando a lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em Accurel EP-100. Neste trabalho, os autores observaram que as constantes de velocidade para a alcóolise são maiores que para a hidrólise e concluíram que elevadas concentrações iniciais de etanol levam a um maior rendimento em EEAG e a menores teores de AGLs ao término da reação, enquanto que, com menores quantidades de etanol, ocorre maior formação de AGLs no produto final.

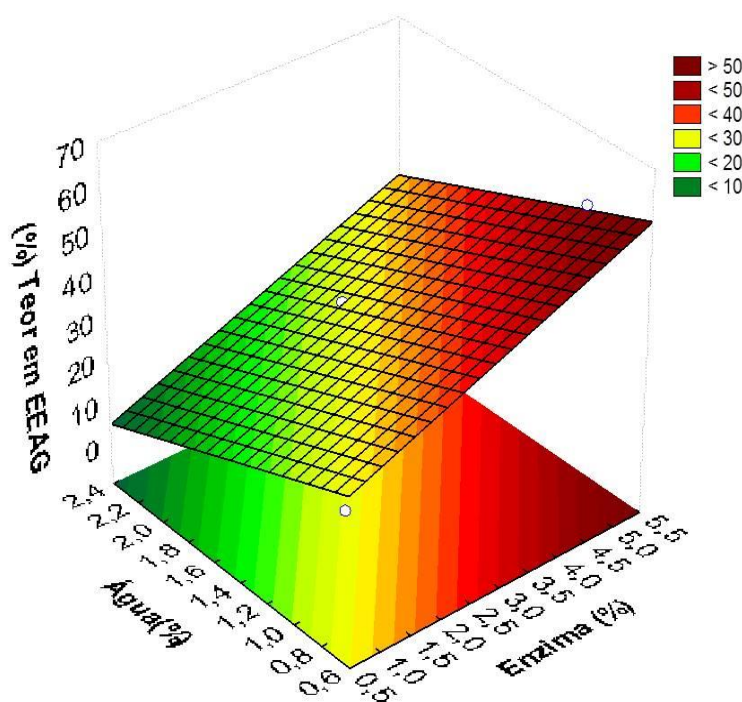


FIGURA 22. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE ÁGUA (%) E ENZIMA (%) SOB A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.

HAIGH *et al.* (2012), monitoraram em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas a conversão simultânea de AGLs e TAGs catalisada pela N435 a 60 °C em reator *batch*, bem como a formação de mono e diacilglicerídeos durante a metanólise de um óleo residual que continha teor de acidez de 6,4%, 60 °C. Estes autores observaram que, decorridas 4 h de reação, a produção de EMAG foi 3 vezes maior que o consumo de AGLs neste sistema, havendo o consumo rápido de diacilglicerídeos, um acúmulo de monoacilglicerídeo e um pequeno consumo de triacilglicerídeos, demonstrando que as reações acontecem simultaneamente nestes sistemas. Entretanto, dados de teor de água não foram relatados neste estudo.

Após a análise das respostas deste planejamento e a obtenção de baixos teores em EEAG dentro da região experimental estudada, constatou-se a necessidade de outra otimização para alcançar conversões elevadas em ésteres etílicos. Desta forma, as variáveis independentes razão molar e quantidade de enzima, que apresentaram efeitos positivos significativos nos ensaios anteriores, foram estudadas na forma de um novo planejamento experimental.

3.5. Ajuste das condições da etanólise do óleo residual de fritura em frascos agitados

Visando ajustar o processo de produção para atingir conversões acima de 90% em menores tempos reacionais, o efeito das variáveis quantidade de enzima e razão molar (etanol:óleo) foram estudados em tempos reacionais de 10 h, visto que estas representaram a maior influência positiva para a obtenção de ésteres etílicos. A otimização destas variáveis foi realizada a partir de um planejamento fatorial 2^2 . Todavia, o modelo apresentou grande falta de ajuste e uma regressão não significativa, o que exigiu a expansão do planejamento a um composto central com projeção em estrela, mediante a adição de quatro pontos axiais. A TABELA 11 apresenta a matriz do planejamento utilizado, bem como os valores observados e modelados.

TABELA 11. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 EM ESTRELA PARA A OTIMIZAÇÃO DA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

Experimento	RM ^a	N435 ^b (%m m ⁻¹)	Teor em EEAG (%)	V.P. ^c
1	10,2:1	3	57,2	59,5
2	9:1	1	29,8	25,4
3	3:1	1	31,2	26,2
4	6:1	0,17	4,4	9,9
5 ^{pc}	6:1	3	70,4	70,5
6 ^{pc}	6:1	3	72,7	70,5
7 ^{pc}	6:1	3	68,1	70,5
8	3:1	5	61,2	70,7
9	6:1	5,83	80,0	80,6
10	1,76:1	3	49,3	53,0
11	9:1	5	81,6	80,7

^a Razão molar de etanol: óleo de fritura;

^b Percentual debiocatalisador adicionada em relação à massa do óleo;

^{pc} Ponto central.

V.P. Valor predito

Pode-se observar na TABELA 11 que as condições experimentais de maior teor em monoésteres etílicos (>80%) foram obtidas em E9 e E11 a 40°C, 200 rpm e 10 h de reação. A estimativa do erro foi calculada a partir dos experimentos E5, E6 e E7, que correspondem à triplicata do ponto central,

obtendo-se com isto, um desvio padrão de apenas 1,5%, o que confere confiabilidade aos resultados obtidos. Os resultados obtidos para os valores preditos encontram-se próximos dos valores observados experimentalmente, indicando um bom ajuste do modelo aos dados, evidência que pode ser confirmada pelo elevado R^2 de 0,982 para uma variância máxima explicada de 0,998, o que confere alta previsibilidade ao modelo. Assim, por meio da análise de variância simples (TABELA 12), pode-se constatar que o modelo desenvolvido é válido estatisticamente.

TABELA 12. PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA SIMPLES PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS RESULTADOS DA TABELA 11.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	F_{tab}
Regressão	6027,46	5	1205,49	53,66	5,05
Resíduos	112,32	5	22,46		
Falta de ajuste	100,79	3	33,6	5,83	19,3
Erro puro	11,53	2	5,76		
Total	6139,78				

A análise de variância evidenciou um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo quadrático (TABELA 12). Isto foi confirmado através do coeficiente de correlação (R^2), da baixa falta de ajuste e dos valores de F . Através do F calculado da regressão, que foi maior que o seu F tabelado, como também do F da falta de ajuste, pode-se demonstrar que o grupo de dados experimentais não representam um artefato matemático e que tendências existem para que equações sejam utilizadas para modelá-los. Posteriormente a estas análises estatísticas, a influência das variáveis sobre a função foi avaliada pela superfície de resposta (FIGURA 24) e pelo gráfico de Pareto (FIGURA 23).

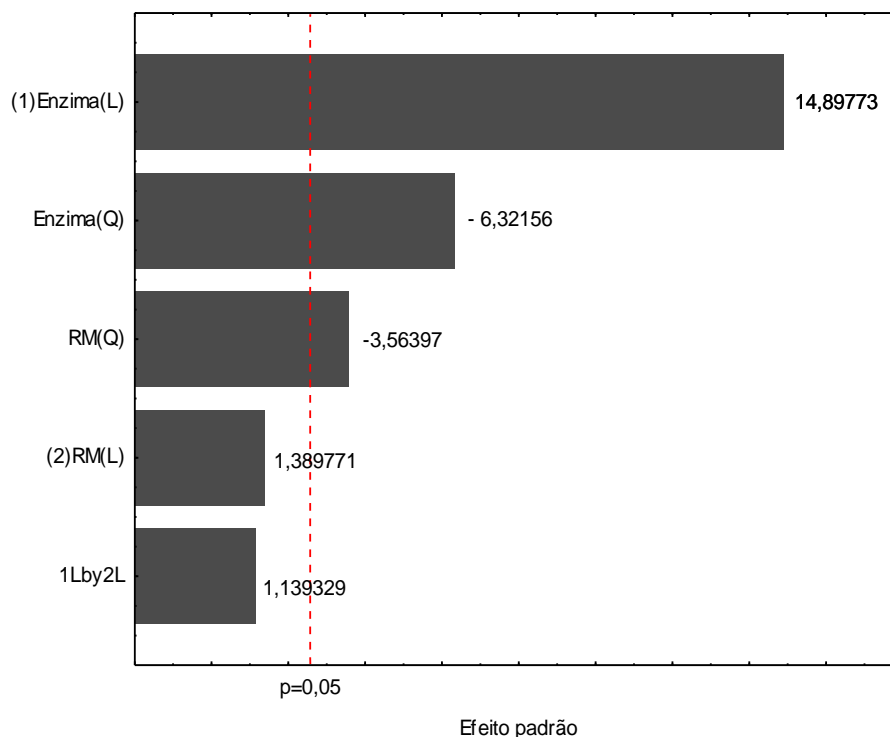


FIGURA 23. DIAGRAMA DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS DEPENDENTES AVALIADAS.

O gráfico de Pareto indicou que, a um nível de confiança de 95%, a quantidade de enzima (L) foi a única variável com efeito positivo sobre o teor de EEAG (+14,89 p.p.), enquanto que um efeito negativo de -6,32 p.p. foi apontado sob a mesma variável, porém, na forma quadrática (ENZ, Q). Este efeito negativo para a quantidade de enzima (Q) pode estar relacionado ao sistema já ter atingindo o equilíbrio em 10 h de reação. Além disso, a variável independente RM (Q) também teve efeito negativo de -3,56 p.p. sobre o teor de EEAG. O efeito primário RM (L) e o efeito secundário ENZ (L) x RM (L) não foram estatisticamente significativo neste intervalo de confiança.

As tendências discutidas no diagrama de Pareto (Figura 23) estão diretamente correlacionadas com a superfície de resposta, sendo possível discutí-los em conjunto. Portanto, após a adequação do modelo quadrático às respostas do planejamento, obteve-se a EQUAÇÃO 6 que foi utilizada para a construção da superfície de resposta da Figura 24.

$$EEAG = -20,34 + 28,69.ENZ - 3,15.ENZ^2 + 8,90.RM - 0,79.RM^2 + 0,45.ENZ.RM$$

Equação 6

onde *ENZ* é a quantidade do biocatalisador adicionado ao meio de reação em relação ao ORF e *RM* representa a razão molar entre etanol:ORF. Feito isso, os dados da TABELA 12 e a EQUAÇÃO 5, construiu-se a superfície de resposta para o modelo em questão (FIGURA 24).

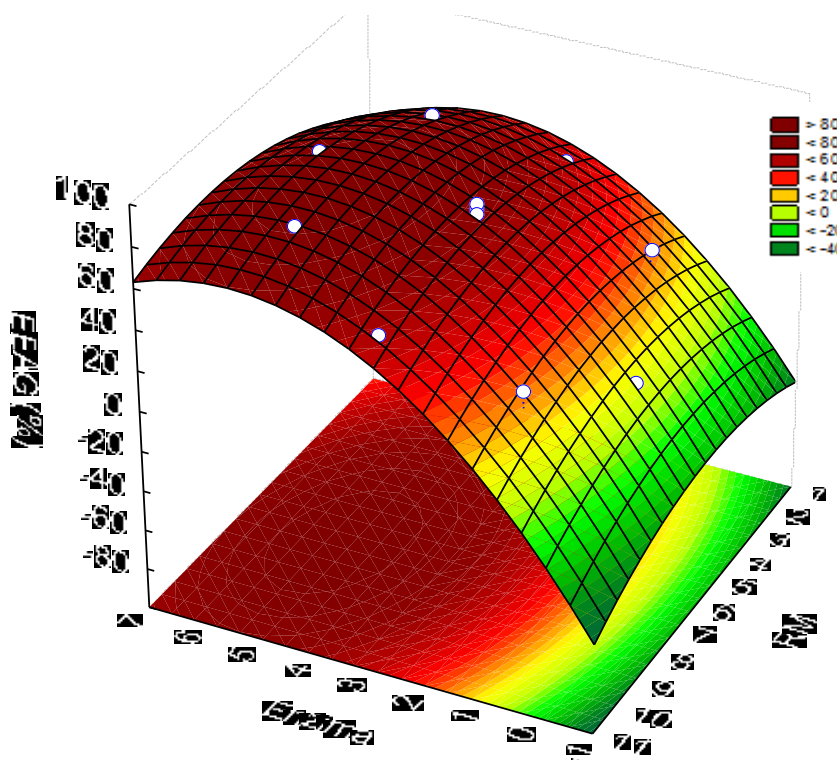


FIGURA 24. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INTERAÇÃO ENTRE ENZIMA E RAZÃO MOLAR PARA A RESPOSTA EM TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS ÁCIDOS GRAXOS.

Com pode ser observado na FIGURA 24, a quantidade de enzima foi a variável dependente com efeito mais positivo sobre o teor de EEAG do produto (14,89 p. p., conforme o gráfico de Pareto), e quantidades de enzima maiores do que 5% já não expressam ganhos sobre esta resposta. Estes dados se comparam com os obtidos por RIBEIRO, SANTOS e ALMEIDA (2012), que realizaram um desenho experimental para a etanólise do óleo de coco utilizando N435. As melhores condições que resultaram em teores de 80,5% em EEAG envolveram RM etanol:óleo de 10:1, 7% de enzima, 60 °C, 200 rpm e 24 h de reação. Estes autores demonstraram que aumentos na RM de 6:1 para 9:1 elevam os rendimentos da reação em 14,03% p.p.. Ainda, para a mesma resposta,

acréscimos de 6,97% p.p. foram observados quando a quantidade de enzima foi aumentada de 3% para 7%. Porém, conforme os autores, considerando o elevado custo da lipase, menores quantidades de enzima que as ótimas deste estudo já seriam suficientes para catalisar eficientemente esta reação.

O ponto experimental realizado para validação do modelo demonstrou resultados satisfatórios, uma vez que o valor previsto para o teor em EEAG foi de 80,5% e os dados experimentais encontrados foram de 76%. Após esta etapa, as condições em que se obteve a melhor resposta em teor de EEAG (Experimento 11) foram utilizadas para a realização dos ensaios de reutilização do biocatalisador.

3.6. Determinação dos componentes polares adsorvidos à lipase e estudo do tratamento com solvente para manutenção da atividade enzimática

O reuso de enzimas é um dos principais fatores que justificam a aplicação destes para a produção biodiesel, visto que a capacidade de reutilização por vários ciclos sem perda da atividade catalítica está relacionada a uma maior viabilidade econômica do processo (STOYTCHEVA *et al.*, 2011).

TAMALAMPUDI *et al.* (2008) estudaram a metanólise do óleo de *Jatropha curcas* em sistema livre de cossolvente. Os autores realizaram ensaios de reuso da lipase N435 sem nenhum tratamento prévio da enzima e, após 5 ciclos reacionais de 90 h, observaram a diminuição de apenas 4,6% no teor de EMAG. Baseado nisto, para confirmar a eficiência de reutilização direta da lipase N435 na etanólise do ORF, empregou-se a enzima sem nenhum tratamento prévio em um novo ciclo de reação e, após cada reuso, registrou-se a massa de lipase N435 recuperada, conforme demonstrado na TABELA 13.

TABELA 13. INFLUÊNCIA DAS MASSAS DE LIPASE RECUPERADAS APÓS CADA CICLO DE REAÇÃO NA CONVERSÃO DE ETANÓLISE.

Lipase	Massa (g)	EEAG (% m m ⁻¹)
Inicial	1,34	95,0
Após 1º Uso	1,39	10,4
Após 2º Uso	1,94	0

Diante do exposto na TABELA 13, observou-se um ganho de massa e

diminuição dos teores em EEAG após cada ciclo de uso da enzima, sendo que não se constatou nenhuma conversão após a sua 2ª utilização, contrariando os dados obtidos por TAMALAMPUDI *et al.* (2008). No entanto, estes autores realizaram as reações de transesterificação com metanol, que é mais polar do que o etanol. Assim, a solubilização do glicerol neste álcool é facilitada, enquanto que a do óleo é diminuída. Portanto, ao longo da reação, o acesso do glicerol produzido ao suporte da enzima foi dificultado, diminuindo efeitos de bloqueio do sítio catalítico, uma vez que este não estaria totalmente disponível no meio de reação para entrar em contato com a enzima.

Após a observação do decréscimo exponencial da atividade catalítica da lipase N435 durante o reuso, simultaneamente ao fato do glicerol não ser observado nas análises cromatográficas de permeação em gel, como também a não ocorrência de separação de fases após o término da reação, determinou-se a quantidade deste coproduto glicerol que permaneceu na fração rica em éster e que foi retida no biocatalisador (TABELA 14). Neste caso, a remoção do glicerol foi feita por lavagem aquosa, conforme o procedimento descrito no item 3.2.9.

TABELA 14. QUANTIFICAÇÃO DE GLICEROL PRESENTE NO MEIO DE REAÇÃO E ADERIDO AO SUPORTE DA LIPASE.

Ciclo de lavagem*	Glicerol (m m ⁻¹)	
	Meio de reação (mg)	Enzima (mg)
1º	8,23 ± 0,02	1300,0 ± 0,06
2º	0,54 ± 0,01	-

* A lavagem da enzima foi realizada apenas uma vez.

Através destes dados concluiu-se que a maior parte do glicerol que poderia ser encontrado no meio de reação (1,31 g), com base no cálculo estequiométrico para o teor em EEAG de 95%, permaneceu aderida ao suporte em que a enzima estava imobilizada (1,30 g) em uma relação mássica de 1,93 g de glicerol por grama de biocatalisador. Este fato confirma as observações de HAMA *et al.* (2011) de que o suporte utilizado para a imobilização da lipase N435 apresenta a capacidade de reter alguns componentes como o glicerol e o etanol do meio de reação, ocasionando em menores conversões em reações de reuso sem tratamento prévio. Estes dados, quando confrontados com as informações contidas na TABELA 13, confirmam o que já foi observado por SÈVERAC *et al.*

(2011), que demonstraram que 0,9 g g⁻¹ glicerol em relação ao suporte gera um rápido decréscimo na atividade ou mesmo uma completa inativação da lipase N435. Este fenômeno de inativação indica que o etanol e a água presentes no meio de reação adsorvem em seu suporte (Lewatit VP OC 1600), visto que esta é uma resina de caráter moderadamente polar (MARTY *et al.*, 1997). Isto provavelmente facilita a formação de uma camada hidrofílica em torno da lipase N435, bloqueando o acesso difusional das moléculas dos substratos hidrofóbicos ao sítio catalítico da enzima, o que limita a transferência de massa e ocasiona no decréscimo da sua atividade catalítica (DOSSAT, COMBES e MARTY, 2002; HAMA *et al.*, 2011; SEVERAC *et al.*, 2011).

O glicerol adsorvido na superfície do suporte pode ser recuperado e comparando-se a qualidade do glicerol obtido via catalise enzimática *versus* o processo tradicional de produção de biodiesel, é importante ressaltar que ainda que retido no biocatalisador, o glicerol obtido via catálise enzimática é de melhor qualidade, sem a necessidade de muitas etapas de purificação para ser empregado em fins mais nobres. Isto se deve ao fato de que catalisadores homogêneos contaminam o coproduto glicerol com seus resíduos de sais, sabão, glicerídeos, ácidos e água (SOTOFT *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012).

HANSEN *et al.* (2009) estudaram a composição química de 11 amostras de glicerol bruto provenientes de 7 indústrias de biodiesel da Austrália que utilizam catálise homogênea em meio alcalino. Estes autores demonstraram que a pureza deste coproduto pode variar de 38-96%, sendo que o restante é composto por metanol (14%) e cinzas (29%). Já o glicerol bruto proveniente de um biodiesel produzido a partir do óleo de girassol pela rota de transesterificação homogênea catalisada por base é composto por glicerol (30%), metanol (50%), sabões (13%), sais de sódio e potássio (2-7%) e outras impurezas (2-3%) (YANG, HANNA e SUN, 2012). Portanto, os catalisadores heterogêneos, como as enzimas imobilizadas, podem assegurar uma melhoria no teor de glicerol da fase glicerínica (YANG, HANNA e SUN, 2012). Segundo HAAS *et al.* (2006), a comercialização do glicerol (US\$ 0,33/kg), em solução aquosa de 80%, garantiria uma redução nos custos de produção do biodiesel de aproximadamente 6%.

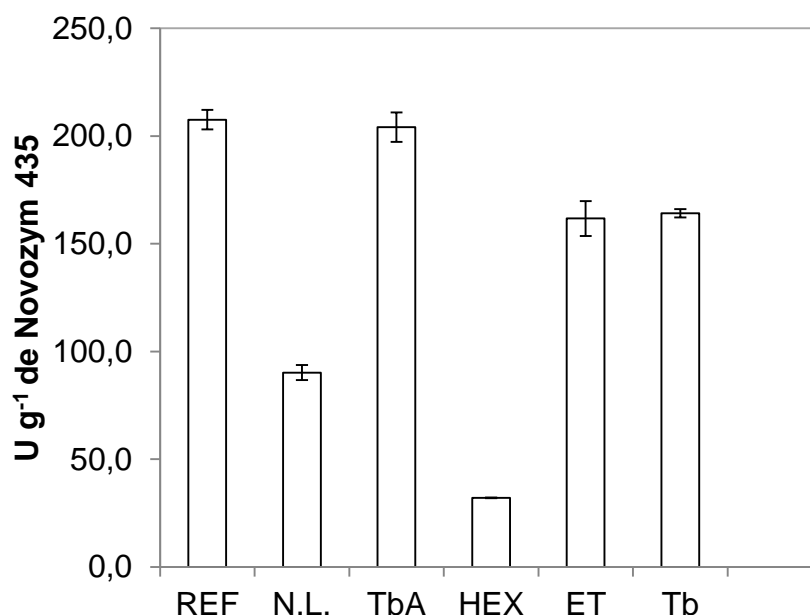
Os resultados obtidos nesta etapa demonstraram que há a necessidade de um tratamento prévio da lipase para seu posterior reuso. Deste modo, realizou-se

ensaios de recuperação da atividade enzimática através de tratamentos distintos e, em seguida, avaliou-se a sua reutilização em reações de etanólise.

3.7. Ensaios de reuso e recuperação da lipase Novozym 435

Conforme demonstrado anteriormente, para que a lipase possa ser reutilizada eficientemente, há a necessidade de aperfeiçoar a remoção de componentes polares para recuperação da enzima sem perdas significativas de atividade catalítica, o que pode garantir a manutenção de altas conversões por diversos ciclos de reação. Para isto, recuperou-se a enzima do meio de reação por filtração simples e esta foi lavada com diferentes solventes, visto que o contato da lipase com solventes hidrofóbicos não a agride estruturalmente, enquanto que, o uso de solvente hidrofílico garantiria a remoção do glicerol adsorvido ao suporte, porém, estes podem retirar a camada de água de hidratação da lipase, afetando sua atividade. Posteriormente, a enzima foi ativada por 1 h em estufa a 40 °C (LERIN *et al.*, 2011) e a sua atividade de esterificação foi determinada conforme o item 3.2.2. (FIGURA 25). Como controle, a atividade de esterificação da lipase N435 também foi avaliada como referência.

Observa-se na FIGURA 25 que a sequência de solventes *terc*-butanol:água apresentou-se como a mais adequada para a remoção do glicerol que está adsorvido ao suporte da lipase, como também na manutenção da atividade enzimática em comparação ao controle. Tal fato está associado à polaridade desta mistura de solventes, cujas propriedades permitem a remoção eficiente de componentes como o glicerol. Além disso, os seus logs *P* (coeficiente de partição octanol:água) fazem com que estes solventes sejam pouco agressivos, o que auxilia na manutenção da estrutura nativa da enzima, característica necessária para a reutilização da lipase com eficácia (LAANE *et al.*, 1986). Este fato pode ser explicado pela incapacidade dessa mistura de solventes em retirar a água associada à enzima, mantendo assim a sua camada de hidratação necessária para a sua atividade catalítica. Ademais, também é conhecido que o impedimento estérico do grupamento hidroxila dos álcoois terciários diminui a interação destes solventes com a enzima (HOLMBERG, 2003). Porém, quando utilizou-se apenas *terc*-butanol para a lavagem da enzima, a sua atividade de esterificação diminuiu 21%.



REF, controle da lipase Ne 435 comercial, sem utilização prévia; N.LAV, lipase N435 usada e não lavada, retirada do meio por filtração; TbA, Sequência de solventes *terc*-butanol:água; Tb, *terc*-butanol; HEX, *n*-hexano e ET., Etanol.

FIGURA 25. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE DE LAVAGEM NA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE NOVOZYM 435.

Já para o tratamento que utilizou *n*-hexano como solvente (log *P* 3,5), a atividade diminuiu em relação à enzima comercial in natura (fresca) provavelmente devido à incapacidade deste solvente na remoção do glicerol adsorvido pelo suporte da lipase, repercutindo em um bloqueio difusional do substrato ao seu sítio ativo (MARTY, DOSSAT e CONDORET, 1997; DOSSAT, COMBES e MARTY, 2002).

O tratamento que utilizou etanol (log *P* -0,24) implicou no decréscimo de 42 p.p. na atividade enzimática de esterificação. Isto sugere que o etanol, por apresentar alta polaridade, consegue remover o glicerol do suporte da N435; entretanto, é danoso à enzima porque retira a sua água associada, causando fenômenos de inativação ou desnaturação que resultam em uma severa redução da sua atividade catalítica (LAANE *et al.*, 1987). Além disso, como relatado por JOSÉ *et al.* (2013), misturas de solventes como etanol/água ou até mesmo o uso de etanol pode ocasionar a dissolução do suporte da lipase N435, o que implicaria em problemas nas etapas subsequentes de reuso.

Com base nestes resultados, o tratamento com *terc*-butanol e água sem aquecimento foi selecionado para os ciclos de reuso da N435 por assegurar a

manutenção da atividade de esterificação e por remover os componentes adsorvidos na enzima. Este tratamento, embora relatado por JOSÉ *et al.* (2013) como eficiente para a recuperação da atividade da N435, diminuiu em 45% o teor em EEAG contido no produto da reação após o 1º ciclo de reuso da N435 (TABELA 15). Ademais, determinou-se um aumento de 2,5% no teor de água no meio de reação. Portanto, este tratamento não resultou na manutenção da atividade da N435 na transesterificação, fato provavelmente associado à presença de água que não é totalmente removida do seu suporte. Assim, realizou-se outro tratamento utilizando apenas o *terc*-butanol para a lavagem da enzima e observou-se que não houve decréscimo significativo no teor de ésteres totais obtido através da reação de etanólise, demonstrando que este é o melhor tratamento para a recuperação e reuso deste biocatalisador nestas reações. Logo, os resultados destes ensaios de reuso estão apresentados na TABELA 15.

TABELA 15. CICLOS DE REUSO DA NOVOZYM 435 LAVADA COM *terc*-BUTANOL E LAVADA COM *TERC*-BUTANOL E ÁGUA, ATIVADA A 40 °C POR 1 HORA NA ETANÓLISE DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

Percentual	1º Uso	2º uso após tratamento da enzima com:	
		<i>terc</i> -butanol e água	<i>terc</i> -butanol
EEAG	76,5 ±1,4	31,9 ±10,4	73,5 ±0,1
Água	0,76 ±0,01	2,6 ±1,0	0,60 ±0,01

Outros autores realizaram tratamentos semelhantes para a reutilização da N435. MACEIRAS *et al.* (2009) avaliaram o reuso da N435 em reações de metanólise do ORF livre de cossolvente. Sob RM metanol:ORF de 1:1 a 50 °C por 8 h de reação, estes autores observaram que a lavagem da enzima com *n*-butanol garantiu a manutenção da atividade catalítica de transesterificação por pelo menos 4 ciclos reacionais.

Após o ajuste das condições experimentais que garantem elevados teores em EEAG em 10 h de reação, vinculado à recuperação da atividade enzimática da N435, ensaios de etanólise em duas etapas foram realizados visando alcançar maiores teores em EEAG.

3.8. Reações de etanolise em duas etapas e cinética do melhor ponto do planejamento composto central

Além da necessidade de otimização de várias condições reacionais, como temperatura, agitação, concentração de catalisador e razão molar álcool:óleo, outros parâmetros limitam a obtenção de conversões totais de transesterificação, como, por exemplo, o equilíbrio termodinâmico da reação (ENCINAR, GONZALEZ e REINARES, 2005). Portanto, a conversão foi realizada em duas etapas nas condições do experimento 11 do planejamento composto central para tentar diminuir a quantidade de mono, di e triacilglicerídeos no produto final (FIGURA 26).

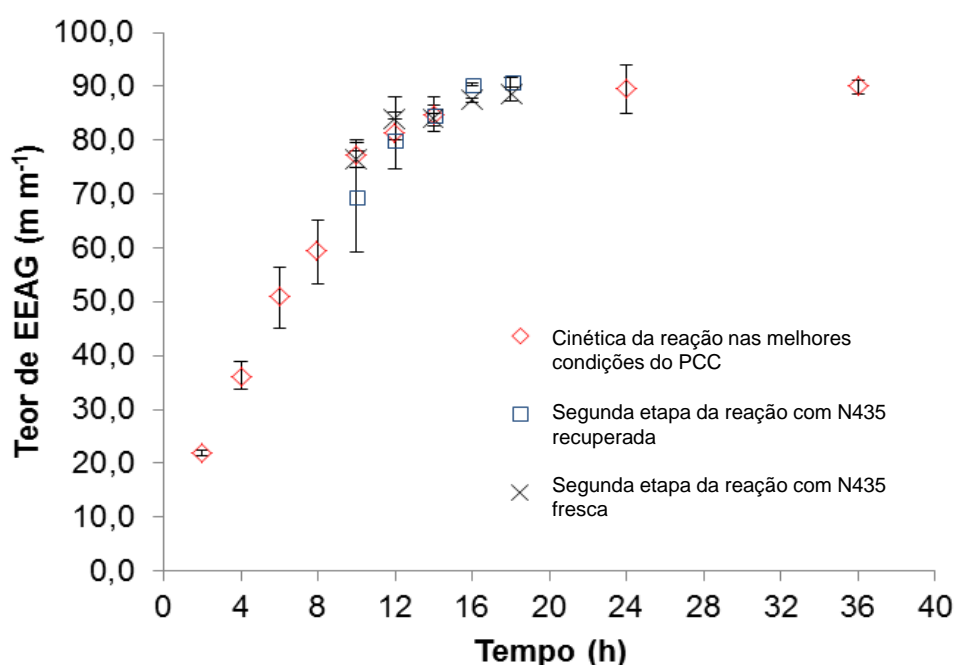


FIGURA 26. TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS (EEAG) OBTIDOS NA MELHOR CONDIÇÃO DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL E EM UMA SEGUNDA ETAPA DE REAÇÃO EMPREGANDO ENZIMA FRESCA E ENZIMA RECUPERADA (EM AMBOS OS CASOS A QUANTIDADE DE ETANOL EMPREGADA NA SEGUNDA ETAPA FOI EQUIVALENTE À DA PRIMEIRA ETAPA).

Conforme observado na FIGURA 26, os experimentos realizados em duas etapas utilizando 100% de etanol, tanto com a enzima fresca como com a enzima recuperada, apresentaram o mesmo comportamento em relação ao teor de EEAG produzido em uma única etapa de reação. Estes resultados demonstraram que a incapacidade da obtenção de maiores teores em EEAG não está relacionada à

perda de atividade da enzima, nem ao que foi relatado por SEVERAC *et al.* (2011) de que o glicerol formado no meio de reação adsorve no suporte da enzima e assim diminui as conversões da transesterificação, visto que este foi removido antes da segunda etapa de reação. Portanto, a não obtenção de maiores teores de ésteres revela que o excesso deste produto no meio de reação dificulta o acesso dos acilglicerídeos, que estão presentes em baixa concentração, ao sítio ativo da enzima. Desta forma, como não se observou diferenças expressivas através do emprego desta estratégia, o consumo de acilglicerídeos e a formação de ésteres etílicos foi acompanhado por cromatografia de permeação em gel em reação realizada em apenas uma etapa (FIGURA 27).

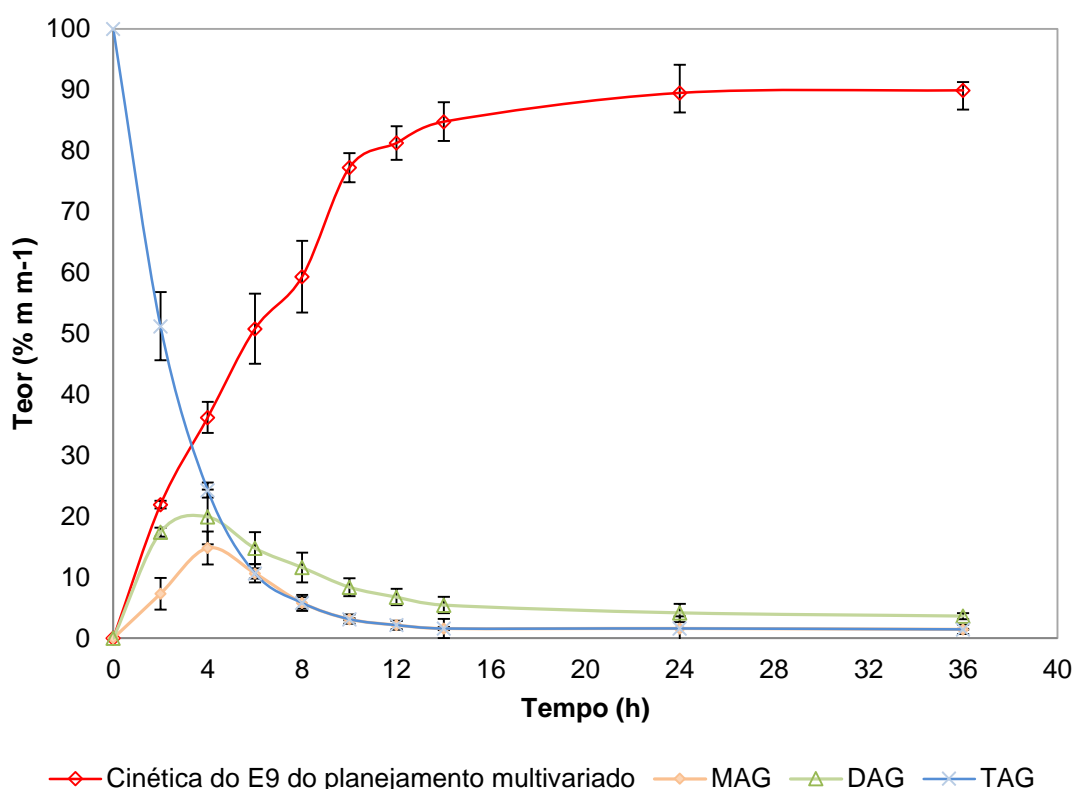


FIGURA 27. CINÉTICA DA REAÇÃO QUE RESULTOU NO MAIOR TEOR EM ÉSTERES ETÍCOS DE ÁCIDOS GRAXOS DO PLANEJAMENTO ESTRELA (PONTO E9).

Como pode ser observado na FIGURA 27, o consumo de triacilglicerídeos foi muito rápido e ambos os demais acilglicerídeos apresentaram um máximo em aproximadamente 4 h de reação, sendo que os monoacilglicerídeos se apresentaram como os maiores contaminantes do produto final. Tal tendência já foi demonstrada por KÖSE, TÜTER e AKSOY (2002), que monitoraram o

consumo destes três componentes em uma reação de alcóolise catalisada pela N435.

Os resultados deste trabalho, quando avaliados pelo teste de Tukey (dados não mostrados) em um nível de confiança de 95%, demonstraram que o consumo dos acilglicerídeos é mais rápido no início da reação e que, decorridas 8 h de reação, as taxas de reação passam a ser muito lentas. Em função disto, as conversões de acilglicerídeos a ésteres etílicos não diferiram estatisticamente a partir de 10 h até o final da reação. Isto sugere que após este tempo reacional o equilíbrio desta reação já foi alcançado, o que dificultaria a obtenção de maiores teores de EEAG nestas condições.

3.9. Caracterização do produto de maior teor em EEAG

O produto de maior teor em EEAG (76,5%) foi obtido nas condições de 5% de Novozym 435 (m m^{-1}) e razão molar etanol: óleo de 9:1 em 10 h de reação. Esta reação foi acompanhada por 36 h e o seu produto foi caracterizado segundo alguns parâmetros da Resolução nº 45 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis e pelo índice de peróxido (TABELA 17). Além disso, foi realizada a análise do perfil cromatográfico em ésteres alquílicos por cromatografia gasosa (TABELA 16).

TABELA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÉSTERES ETÍLICOS FORMADOS MAJORITARIAMENTE A PARTIR DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.

Ésteres alquílicos	ORF ^a	EEAG ^b
Palmitato	11,11	10,30
Estearato	3,81	3,21
Oleato	25,23	21,90
Linoleato	49,58	37,05
Outros	11,30	15,50

^a Percentual mássico de ésteres da matéria-prima

^b Percentual mássico de ésteres do produto final

Os dados da Tabela 16 demonstraram que dentre os ésteres que poderiam ser formados a partir do óleo residual de fritura, os componentes de cadeias carbônicas saturadas, palmitato e estearato, e com menor número de duplas ligações (oleato) foram sintetizados majoritariamente. Isto pode estar

relacionado com o fato de que moléculas com duplas ligações na conformação Z apresentam uma cadeia carbônica distorcida, o que dificultaria o contato entre o sítio ativo da enzima e o seu substrato (SHIMADA *et al.*, 2002).

TABELA 17. PARÂMETROS CARACTERIZADOS DO PRODUTO FINAL.

Parâmetros	Limite especificado	Valor obtido
Teor de éster (%), mín.	96,5% (m m ⁻¹)	88,4 ± 0,1
Monoacilglicerídeo, máx.	0,70% (m m ⁻¹)	5,0 ± 0,8
Diacilglicerídeo, máx.	0,20% (m m ⁻¹)	3,6 ± 0,5
Triacilglicerídeo, máx.	0,20% (m m ⁻¹)	1,4 ± 0,1
Estabilidade oxidativa a 110 °C, mín.	12 h	0,16 ± 0,02
Estabilidade oxidativa a 110 °C com adição de DBPC	12 h	1,09 ± 0,11
Índice de acidez, máx.	0,5 mg KOH g ⁻¹	6,13 ± 0,46
Índice de peróxido	n.c.*	122,6 ± 15,6

* n.c., não consta na especificação de nº 45 da RANP.

Os valores obtidos para os parâmetros especificados na TABELA 16 demonstram que os ésteres obtidos não se enquadram nas normas de qualidade do biodiesel estabelecidas pela ANP. Por exemplo, o teor final de EEAG foi 8,3% inferior ao mínimo requerido de 96,5%. Teores de ésteres similares foram obtidos por ZHAO *et al.* (2014), RIBEIRO *et al.* (2012) e ROSSET *et al.* (2011) e estes estão condizentes com dados da literatura, embora CERVERÓ, ALVAREZ e LUQUE (2014) tenham aparentemente alcançado conversão totais do óleo de soja em EEAG após 72 h de reação.

As análises do percentual mássico dos mono, di e triglicerídeos demonstraram que há a necessidade de conversão destes componentes para que os ésteres etílicos produzidos se enquadrem na regulamentação. Além disso, os índices de acidez e de teor de água encontrados se apresentaram fora dos limites especificados pela norma. Estes dados indicam que o produto obtido requer alguma etapa de purificação, conforme demonstrado por BERRIOS *et al.* (2011), que removeu estes componentes por extração líquido-líquido ou por adsorção em resina de troca catiônica ou silicato de magnésio.

A determinação da estabilidade oxidativa a 110 °C dos ésteres etílicos produzidos a partir do óleo residual de fritura demonstrou um período de indução

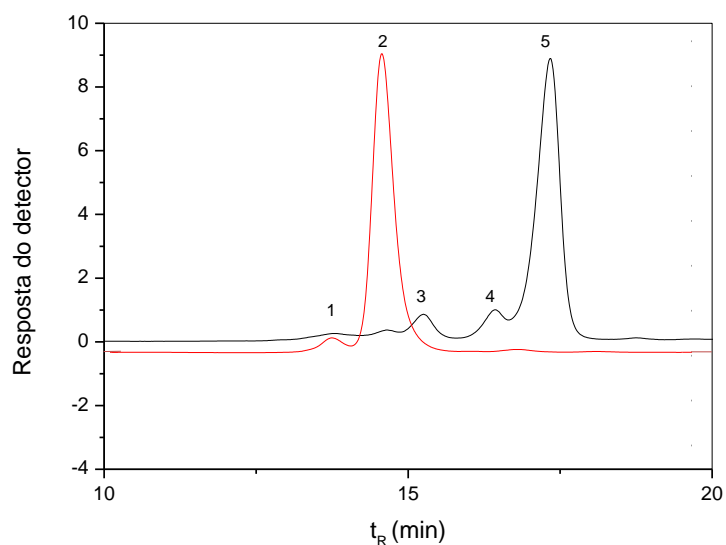
de apenas 0,16 h. Este resultado está associado à ausência de antioxidantes naturais (e.g. tocoferóis) normalmente presentes no óleo e ao grau de insaturação de alguns ácidos graxos presentes no material. Além disso, a exposição do ORF às reações térmicas e oxidativas, que ocorrem na cocção dos alimentos levam à formação de compostos de degradação (hidroperóxidos) que são responsáveis por diminuir ainda mais este parâmetro (MITTELBACH e ENZELSBERGER, 1999). Portanto, a adição de antioxidantes é uma prática utilizada para aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel. Isto é importante para que este biocombustível possa ser armazenado, evitando assim reações de degradação que diminuem a qualidade do produto. Os antioxidantes adicionados agem naturalmente no retardamento das reações de oxidação porque eliminam os radicais gerados na fase de iniciação destas reações, impedindo que as reações em cadeia se propaguem (FOCKE *et al.*, 2012).

A estabilidade oxidativa está diretamente relacionada ao índice de peróxido, sendo que valores elevados para o segundo parâmetro indicam que baixos resultados de estabilidade serão encontrados no produto (ENCINAR, GONZÁLEZ e RODRÍGUEZ-REINARES, 2007). Assim, determinaram-se os valores de I.P. nos ésteres ($122,6 \pm 15,6$), sendo encontrados valores 54,2% maiores do que o observado no material graxo de partida, o que demonstra que mesmo em reações que utilizam temperaturas brandas (40 °C), ainda há formação de compostos de degradação.

É interessante ressaltar que, neste trabalho, a adição 1000 ppm do antioxidante DBPC aos EEAG (TABELA 16), com o objetivo de elevar a estabilidade oxidativa deste material, resultou em um aumento de 6,8 vezes neste parâmetro em relação ao ORF não aditivado. ARAÚJO *et al.* (2009) avaliaram a influência da concentração do DBPC na melhoria da estabilidade oxidativa a 110 °C de EMAG oriundos do óleo da mamona. Estes autores demonstraram que esta relação é linear e que a adição de mais antioxidante resulta em maior estabilidade oxidativa a 110 °C; desta maneira, aumentar a quantidade adicionada de antioxidante aos ésteres poderia elevar sua estabilidade. Todavia, a adição de maiores quantidades de antioxidantes como o DBPC é inviável economicamente, além de que estes, em excesso, podem não cumprir eficientemente o seu principal papel como inibidores da etapa de iniciação das reações de oxidação.

Após os baixos resultados para o parâmetro estabilidade oxidativa a 110

°C, realizou-se a análise do produto por CPG (FIGURA 28).



¹Produtos de degradação do óleo (t_R 13,76 min); ² Triacilglicerídeos do óleo residual de fritura (t_R 14,48 min); ³Diacilglicerídeos (t_R 14,97 min); ⁴ Monoacilglicerídeos (t_R 16,38 min); ⁵ Ésteres etílicos do ORF (t_R 17,96 min).

FIGURA 28. CROMATOGRAMAS DE PERMEAÇÃO EM GEL DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA ANTES E APÓS A REAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA.

Os principais efeitos da presença de compostos de degradação de alta massa molar nos EEAG (FIGURA 28) são o aumento na sua viscosidade e o aumento nos seus resíduos de carbono após a combustão. Isto pode estar relacionado às ligações duplas presentes nos ácidos graxos de óleos e gorduras, que favorecem reações térmicas e oxidativas tanto no material graxo quanto nos seus ésteres alquílicos. Assim, estes processos termo-oxidativos levam a produtos insolúveis que geram problemas nas bombas injetoras de motores do ciclo diesel (MITTELBACH e GANGL, 2001). Porém, MITTELBACH e GANGL (1998) demonstraram que, durante a transesterificação homogênea em meio alcalino (KOH), os componentes de alta massa molar como dímeros e trímeros de triacilglicerídeo são quebrados e transformados em ésteres metílicos diméricos e triméricos, respectivamente. Estes autores também demonstraram, em um projeto Irlandês denominado ALTENER, que ao rodar dois ônibus durante 3 anos apenas com biodiesel produzido a partir de óleos contaminados com dímeros e trímeros, não se observou problemas nas peças e nem no desempenho do motor, demonstrando que há uma certa tolerância deste à presença de componentes de

alta massa molar no produto final. Desta forma, a presença destes contaminantes não limitaria a aplicação deste combustível.

4. CONCLUSÃO

A caracterização do óleo residual de fritura indicou variação em alguns parâmetros físicos e químicos em relação ao óleo de soja refinado. Ademais, foi constatada a presença de compostos de degradação do óleo residual de fritura e, dentre estes, produtos de alta massa molar derivados dos processos térmicos aos quais a matéria-prima foi exposta.

Os estudos preliminares demonstraram que o uso de 10% de *n*-hexano em relação à massa do óleo residual de fritura é desnecessário, visto que o seu emprego não causou modificações na cinética da reação de etanolise. Além disso, em outros ensaios, o aumento da razão molar de 3:1 para 9:1 ocasionou uma elevação de 7 p.p no teor de ésteres etílicos e que o uso de razões molares na faixa de 4:1 a 9:1 proporcionou a obtenção de maiores teores em ésteres etílicos sem afetar a atividade catalítica da Novozym 435. Ainda, o aumento de 2% para 5% da quantidade de lipase aumentou as conversões em ésteres em 45% após 10 h de reação e o teor de água de 0,5% em relação à massa do óleo residual de fritura foi ideal para o processo de conversão.

A partir do planejamento fatorial que combinou as variáveis razão molar, porcentagem de enzima, água e teor de ácidos graxos livres não foi possível obter teores totais maiores que 60% em ésteres etílicos. Segundo os resultados das análises estatísticas deste estudo, o elevado teor de água (L) e ácidos graxos livres (Q) apresentaram efeito negativo e os parâmetros porcentagem de enzima e razão molar (L) causaram efeito positivo na resposta avaliada. Por meio deste estudo, foi possível verificar teores totais em ésteres etílicos de 59,7%, teores de transesterificação de 11,7% e para todas as reações teores de esterificação >74% em 8 h, 40 °C e 150 rpm. Já para o delineamento em projeção estrela, elevados teores de até 81,6% em ésteres foram obtidos quando se empregou razão molar etanol:óleo de 9:1 e 5% de enzima transcorridas 10 h, a 40 °C e 150 rpm. Este modelo não apresentou efeitos de segunda ordem significativos e a quantidade de Novozym 435 (L) foi o parâmetro de efeito positivo mais pronunciado.

A determinação do teor de glicerol demonstrou que este permaneceu praticamente todo adsorvido no suporte da enzima, demonstrando a necessidade de tratamentos com solventes para possibilitar o seu reuso. Neste sentido, uma etapa de lavagem com *tert*-butanol foi suficiente para a remoção de componentes polares aderidos à lipase, assegurando a obtenção de altos teores de EEAG em

reações de reuso sem o favorecimento de reações paralelas como a hidrólise. Por outro lado, a estratégia de adição da enzima em duas etapas não se demonstrou atraente para aumentar o teor de EEAG no produto final, que atingiu 90% na reação em uma etapa após 18 h de reação.

Os resultados de caracterização do produto obtido demonstraram que os ésteres etílicos encontram-se apenas 8,1% abaixo do teor em éster especificado pela norma. Ademais, o índice de peróxido e a estabilidade oxidativa a 110 °C evidenciaram a presença de componentes de degradação no produto final, que foi caracterizado por cromatografia de permeação em gel e pode-se notar a conservação deste material desde a matéria-prima, de modo que estes não foram convertidos com a utilização da Novozym 435 nestes sistemas. A presença de compostos de degradação no biodiesel não é preocupante porque a estabilidade deste produto pode ser aumentada 6,8 vezes com a adição de 2,6-di-*terc*-butil-p-cresol como antioxidante e existem estudos do uso de combustíveis obtidos a partir de óleos residuais de fritura que apresentavam estes contaminantes em sua composição, sendo que estes não foram prejudiciais aos motores do ciclo diesel.

5. REFERÊNCIAS

- AARTHY, M., SARAVANAN, P., GOWTHAMAN, M. K., ROSE, C., KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, p. 1591-1601, 2014.
- ADACHI, D., KODA, R., HAMA, S., YAMADA, R., NAKASHIMA, K., OGINO, C., KONDO, A. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 118-122, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D., CASTRO, A. M., LANGONE, M. A. P., FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, v. 135, p. 315-321, 2014.
- AL-ZUHAIR, S., LING, F. W., JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 951-960, 2007. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 5 ed. Champaign, 2003.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível < <http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em: 07/03/2015.
- ARANSIOLA, E. F., OJUMU, T. V., OYEKOLA, O. O., MADZIMBAMUTO, T. F., IKHU-OMOREGBE, D. I. O. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy*, v. 61, p. 276-297, 2014.
- ARAÚJO, S. V., LUNA, F. M. T., ROLA JR. E. M., AZEVEDO, D. C. S., CAVALCANTE JR, C. L. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 1272–1277, 2009.
- ARAÚJO, C. D. M.; ANDRADE, C. C.; SILVA, E. S.; DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 445-452, 2013.
- BAJAJ, A., LOHAN, P., JHA, P. N. e MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B., STOJKOVIĆ, I. J., STAMENKOVIĆ, O. S., VELJKOVIC, V. B., HUNG, Y. T. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 32, p. 238-254, 2014.
- BERRIOS, M., MARTÍN, M. A., CHICA, A. F., MARTÍN, A. Study of esterification and transesterification in biodiesel production from used frying oils in a closed system. *Chemical Engineering Journal*, v. 160, p. 473-479, 2010.
- BERRIOS, M., MARTÍN, M. A., CHICA, A. F., MARTÍN, A. Purification of biodiesel from used cooking oils. *Applied Energy*, v. 88, p. 3625-3631, 2011.
- BOUAID, A., MARTINEZ, M., ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel*, v. 86, p. 2596-2602, 2007.

- CABRERA, Z., FERNANDEZ-LORENTE, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J. M. e GUIBAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 171-176, 2009.
- CAMPANELLI, P., BANCHERO, M., MANNA, L. Synthesis of biodiesel from edible, non-edible and waste cooking oils via supercritical methyl acetate transesterification. *Fuel*, v. 89, n. 12, p. 3675-3682, 2010.
- CERVERÓ, J. M., ÁLVAREZ, J. R., LUQUE, S. Novozym 435- catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, v.61, p. 131-137, 2014.
- CHAMOULEAU, F., COULON, D., GIRARDIN, M., GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, p. 949-954, 2001.
- CHANG, S. S., PETERSON, R. J., HO, C. T. Chemical Reactions Involved in the Deep-fat Frying of Foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* v. 55, p. 718-727, 1978.
- CHEIRSILP, B., H-KITTIKUN, A., LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 42, p. 261-269, 2008.
- CHEN, Y., XIAO, B., CHANG, J., FU, Y., LV, P., WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 668-673, 2009.
- CHESTERFIELD, D. M., ROGERS, P. L., AL-ZAINI, E. A., ADESINA, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chemical Engineering Journal*, v. 207-208, p. 701-710, 2012.
- CHRISTOPHER, L. P., HEMANATHAN, K., ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p. 497-520, 2014.
- CLARK, S. J., WAGNER, L., SCHROCK, M. D., PIENAAR, P. G. Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 61, p. 1632-1638, 1984.
- CORDEIRO, C. S., SILVA, F. R., WYPYCH, F., RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel) *Quim. Nova*, v. 34, p. 477-487, 2011.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 31, n. 5-6, p. 466-487, 2005.
- DENG, L., XU, X., HARALDSSON, G. G., TAN, T., WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. *JAOCs*, v. 87, p. 341-347, 2005.
- DOMINGOS, A. K., SAAD, E. B., WILHELM, H. M., RAMOS, L. P. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresour Technol*, v. 99, p. 1837-45, 2008.
- DOSSAT, V., COMBES, D., MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 90-94, 2002.

- ENCINAR, J. M., GONZALEZ, J. F., REINARES, A. R. Biodiesel from Used Frying Oil. Variables Affecting the Yields and Characteristics of the Biodiesel. *Ind. Eng. Chem. Res*, v. 44, p. 5491-5499, 2005.
- ENCINAR, J. M., GONZÁLEZ, J. F., RODRÍGUEZ-REINARES, A. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. *Fuel Processing Technology*, v. 88, n. 5, p. 513-522, 2007.
- FIGGE, K. Dimeric Fatty Acid Methyl Esters. I. Mechanisms And Products Of Thermal And Oxidative-Thermal Reactions Of Unsaturated Fatty Acid Esters - Literature Review. *Chem. Phys. Lipids*, v. 6, p. 164-182, 1971.
- FJERBAEK, L., CHRISTENSEN, K. V., NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng*, v. 102, p. 1298-315, 2009.
- FOCKE, W. W., WESTHUIZEN, I. V. D., GROBLER, A. B. L., NSHOANE, K. T., REDDY, J. K., LUYT, A. S. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. *Fuel*, p. 227-233, 2012.
- FORESTI, M. L., ERRAZU, A., FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. *Biochemical Engineering Journal*, v. 25, p. 69-77, 2005.
- GEORGOGIANNI, K. G., KATSOULIDIS, A. P., POMONIS, P. J., KONTOMINAS, M. G. Transesterification of soybean frying oil to biodiesel using heterogeneous catalysts. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 671-676, 2009.
- GHADGE, S. V., RAHEMAN, H. Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 601-605, 2005.
- GLOGAUER, A., MARTINI, V. P., FAORO, H., COUTO, G. H., MÜLLER-SANTOS, M., MONTEIRO, R. A., MITCHELL, D. A., M DE SOUZA, E., PEDROSA, F. O., KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*, v. 10, p. 1-15, 2011.
- GUI, M. M., LEE, K. T., BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, v. 33, p. 1646-1653, 2008.
- GULDHE, A., SINGH, B., MUTANDA, T., PERMAUL, K., BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447-1464, 2015.
- GUO, M., SONG, W., BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 712-725, 2015.
- HAAS, M. J., MCALOON, A. J., YEE, W. C., FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour Technol*, v. 97, p. 671-8, 2006.
- HAIGH, K. F., SAHA, B., VLADISAVLJEVIĆ, G. T., REYNOLDS, J. C. Kinetics of the Pre-Treatment of Used Cooking Oil Using Ne 435 for Biodiesel Production. *Procedia Engineering*, v. 42, p. 1106-1113, 2012.
- HAMA, S., TAMALAMPUDI, S., YOSHIDA, A., TAMADANI, N., KURATANI, N., NODA, H., FUKUDA, H., KONDO, A. Process engineering and optimization of

glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10419-24, 2011.

HANSEN, C. F., HERNANDEZ, A., MULLAN, B. P., MOORE, K., TREZONA-MURRAY, M., KING, R. H., PLUSKE, J. R. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Animal Production Science*, v. 49, p. 154-161, 2009.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

ISSARIYAKUL, T., KULKARNI, M. G., DALAI, A. K., BAKHSHI, N. N. Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Processing Technology*, v. 88, p. 429-436, 2007.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E., REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 1998.

JOSÉ, C., AUSTICB, G. B., BONETTO, R. D., BURTON, R. M., BRIANDA, L. E. Investigation of the stability of N[®] 435 in the production of biodiesel. *Catalysis Today*, v. 213, p. 73-80, 2013.

KANSEDO, J., LEE, K. T., BHATIA, S. Cerbera odollam (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Fuel*, v. 88, p. 1148-1150, 2009.

KIAKALAIEH, A. T., AMINA, N. A. S., MAZAHARI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy*, v. 104, p. 683-710, 2013.

KNOTHE, G. Structure Indices in FA Chemistry. How Relevant Is the Iodine Value? *JAOCS*, v. 79, p. 847-854, 2002.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. Manual do Biodiesel. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KUCEK, K. T., CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F., WILHELM, H. M., RAMOS, L. P. Ethanolysis of Refined Soybean Oil Assisted by Sodium and Potassium Hydroxides. *JAOCS*, v. 84, p. 385-392, 2006.

KUSDIANA, D., SAKA, S. Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 289-295, 2004.

LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 1986; 30: 81-7. *Biotechnol Bioeng*, v. 102, p. 2-8; discussion 1, 1987.

LEE, A. F., BENNETT, J. A., MANAYIL, J. C., WILSON, K. Heterogeneous catalysis for sustainable biodiesel production via esterification and transesterification. *Royal Society of Chemistry*, p. 2014.

LERIN, L., CENI, G., RICHETTI, A., KUBIAK, G., OLIVEIRA, J. V., TONIAZZO, G., TREICHEL, H., OESTREICHER, E. G., OLIVEIRA, D. Successive cycles of

utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, p. 181-188, 2011.

LISBOA, P., RODRIGUES, A. R., MARTÍN, J. L., SIMÕES, P., BARREIROS, S., PAIVA, A. Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 85, n. p. 31-40, 2014.

MA, F., HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1999.

MAHESH, S. E., RAMANATHAN, A., BEGUM, K. M., MEERA S., NARAYANAN, A. Biodiesel production from waste cooking oil using KBr impregnated CaO as catalyst. *Energy Conversion and Management*, v. 91, p. 442-450, 2015.

MANJÓN, A., IBORRA, J. L., AROCAS, A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. *Biotechnol. Lett*, v. 13, p. 339-344, 1991.

MARTINS, G. B. C., MELLO, V. M., SUAREZ, P. A. Z. Processos Térmicos em Óleos e Gorduras *Rev. Virtual Quim.*, v. 5, p. 16-25, 2013.

MARTY, A., DOSSAT, V., CONDORET, J. S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol Bioeng*, v. 56, p. 232-237, 1997.

MEHER, L. C., SAGAR, D. V., NAI, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, p. 248–268, 2006.

MEI, Y., MILLER, L., GAO, W., GROSS, R. A. Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 70-74, 2003.

MENDOW, G., MONELLA, F. C., PISARELLO, M. L., QUERINI, C. A. Biodiesel production from non-degummed vegetable oils: Phosphorus balance throughout the process. *Fuel Processing Technology*, v. 92, p. 864-870, 2011a.

MENDOW, G., VEIZAGA, N. S., QUERINI, C. A. Ethyl ester production by homogeneous alkaline transesterification: Influence of the catalyst. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6385-6391, 2011b.

MENEZES, R. S., LELES, M. I. G., SOARES, A. T., FRANCO, P. I. B. M., ANTONIOSI FILHO, N. R., SANT'ANNA, C. L., VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Quim. Nova*, v. 36, p. 10-15, 2013.

MITTELBACH, M., ENZELSBERGER, H. Transesterification of Heated Rapeseed Oil for Extending Diesel Fuel. *JAOCS*, v. 76, p. 545-550, 1999.

MME- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível < <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel>>. Acesso em: 10/02/2015.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal Lipid Science Technology*, v. 110, p. 692–700, 2008.

NOUREDDINI, H., GAO, X., PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 769-777, 2005.

- OLIVEIRA, D., LUCIO, M. D., FACCIO, C., DALLA ROSA, C., BENDER, J. P., LIPKE, N., MENONCIN, S., AMRONGISKI, C., OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113-116, p. 771-780, 2004.
- OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂. *Journal of Supercritical Fluids* v. 19, p. 141-148, 2001.
- OMONOV, T. S., KHARRAZ, E., CURTIS, J. M. Ozonolysis of Canola Oil: A Study of Product Yields and Ozonolysis Kinetics in Different Solvent Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, p. 689-705, 2010.
- PATIL, P. D., DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. *Fuel*, v. 88, p. 1302-1306, 2009.
- PEDERSEN, A., NORDBLAD, M., NIELSEN, P. M., WOODLEY, J. M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 105, p. 89-94, 2014.
- PERALTA-ZAMORA, P. G., MORAIS, J. L., NAGATA, N. Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, p. 106-110, 2005.
- PISARELLO, M. L., DALLA COSTA, B., MENDOW, G., QUERINI, C. A. Esterification with ethanol to produce biodiesel from high acidity raw materials. *Fuel Processing Technology*, v. 91, p. 1005-1014, 2010.
- PIYATHEERAWONG, W., IWASAKI, Y., XU, X., YAMANE, T. Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 28, p. 19-24, 2004.
- POUSA, P. A. G., SANTOS, A. L. F., SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v.35, p. 5393-5398, 2007.
- RAITA, M., CHAMPREDA, V., LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 829-834, 2010.
- RAMOS, L. P., SILVA, F. R., MANGRICH, A. S., CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Revista virtual de química*, v.3, p. 385-405, 2011.
- RAMOS, L. P., WILHEMN, M. H. Current status of biodiesel development in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 807-819, 2005.
- RIBEIRO, B. D., DE CASTRO, A. M., COELHO, M. A., FREIRE, D. M. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res*, v. 2011, p. 615803, 2011.
- RIBEIRO, L. M. O., SANTOS, B. C. D. S., ALMEIDA, R. M. R. G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. *Biomass and Bioenergy*, v. 47, p. 498-503, 2012.
- RUIZ-MÉNDEZ, M. V., MARMESAT, S., LIOTTA, A., DOBARGANES, M. C. Analysis of used frying fats for the production of biodiesel. *Grasas y aceites*, v. 59, p. 45-50, 2008.
- SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, p. 199-210, 1997.

SERRES, J. D. S., SOARES, D., CORAZZA, M. L., KRIEGER, N., MITCHELL D. A. Liquid-liquid equilibrium data and thermodynamic modeling for systems related to the production of ethyl esters of fatty acids from soybean soapstock acid oil. *Fuel*, v. 147, p. 146-154, 2015.

SEVERAC, E., GALY, O., TURON, F., PANTEL, C. A., CONDORET, J. S., MONSAN, P., MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. *Enzyme Microb Technol*, v. 48, n. 1, p. 61-70, 2011.

SHAH, S., GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, p. 133-142, 2002.

SOARES, D., PINTO, A. F., GONÇALVES, A. G., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 15-23, 2013.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. Química Orgânica 2. 7ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 2002.

SOTOFT, L. F., RONG, B. G., CHRISTENSEN, K. V., NORDDAHL, B. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresour Technol*, v. 101, p. 5266-74, 2010.

STEEL, C. J., DOBARGANES, M. C., BARRERA-ARELLANO, D. Formation of polymerization compounds during thermal oxidation of cottonseed oil, partially hydrogenated cottonseed oil and their blends. *GRASAS Y ACEITES*, v. 57, p. 284-291, 2006.

TAKASE, M., MIN, T. Z. T., CHENB, Y., LIU, H., YANG, L., WUB, X. An expatiate review of neem, jatropha, rubber and karanja as multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 43, p. 495-520, 2015.

TALUKDER, M. M. R., CHUANWU, J., NGUYEN, T. B. V., FEN, N. M., MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p. 106-112, 2009.

TALUKDER, M. M. R., WU, J. C., CHUA, L. P.-L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy & Fuels*, v. 24, p. 2016-2019, 2010.

TAMALAMPUDI, S., TALUKDER, M. R., HAMA, S., NUMATA, T., KONDO, A., FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 185-189, 2008.

TISS, A., CARRIERE, F., VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Anal Biochem*, v. 294, p. 36-43, 2001.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível < <http://www.unica.com.br/>> Acesso em: 23/03/2015.

- UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S., JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, v. 2, p. 293-308, 1994.
- VELJKOVIĆ, V. B., AVRAMOVIĆ, J. M., STAMENKOVIĆ, O. S. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 1193-1209, 2012.
- VERMA, M. L.; AZMI, W. e KANWAR, S. S. Microbial lipases: at the interface of aqueous and non-aqueous media: A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 55, n. 3, p. 265–293, 2008.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v. 9, p. 113-148, 2000.
- WANG, R., HANNA, M. A., ZHOU, W. W., BHADURY, P. S., CHEN, Q., SONG, B. A., YANG, S. Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L. *Bioresour Technol*, v. 102, p. 1194-9, 2011.
- WANG, Y., PENGZHAN, S. O. L., ZHANG, Z. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. *Energy Conversion and Management*, v. 48, p. 184-188, 2007.
- WOLFF, J. P., MORDRET, F. X., DIEFFENBACHER, A. Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. *Pure & Appl. Chern*, v. 63, p. 1163-1171, 1991.
- YADAV, G. D., DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. *Chemical Engineering Science*, v. 59, p. 373-383, 2004.
- YANG, F., HANNA, M. A., SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels*, v. 5, p. 13, 2012.
- ZAKS, A., KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 3192-3196, 1985.
- ZHANG, Y. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol*, v. 89, p. 1-16, 2003.
- ZHANG, Z., HE, F., ZHUO, R. Immobilized lipase on porous silica particles : Preparation and application for biodegradable polymer syntheses in ionic liquid at higher temperature. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. v. 94, p. 129-135, 2013.
- ZHAO, X., QI, F., YUAN, C., DU, W., LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182-197, 2015.